

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio de la relación de los metabolitos bacterianos  
trimetilamina N-óxido y trimetilamina con la  
enfermedad cardiovascular y la función renal en  
pacientes infectados por VIH**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Nuria Sánchez Vega**

DIRECTORES

**Dulcenombre Gómez Garre**  
**Vicente Estrada Pérez**

Madrid, 2019

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



**ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LOS METABOLITOS  
BACTERIANOS TRIMETILAMINA N-ÓXIDO Y TRIMETILAMINA  
CON LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y LA FUNCIÓN  
RENAL EN PACIENTES INFECTADOS POR VIH.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Nuria Sánchez Vega**

**Directores**

**Dulcenombre Gómez Garre  
Vicente Estrada Pérez**

**Madrid, 2018**





**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**PROGRAMA CIENCIAS MEDICO QUIRURGICAS**



**ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE  
TRIMETILAMINA Y TRIMETILAMINA N- OXIDO CON LA  
ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y LA FUNCION RENAL EN  
PACIENTES VIH.**

**TESIS DOCTORAL**

**NURIA SÁNCHEZ VEGA**

**Hospital Clínico San Carlos**

**Madrid, 2018**



DRA. DULCENOMBRE GÓMEZ GARRE, Investigadora del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos, y el DR. VICENTE ESTRADA PÉREZ, Jefe de Sección del Servicio de Medicina Interna/Enfermedades Infecciosas del Hospital Clínico San Carlos

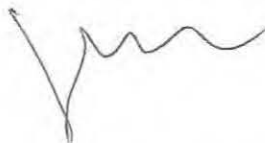
CERTIFICAN:

Que la Tesis titulada **ESTUDIO DE LA RELACION DE LOS METABOLITOS BACTERIANOS TRIMETILAMINA N-OXIDO Y TRIMETILAMINA CON LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y LA FUNCION RENAL EN PACIENTES INFECTADOS POR VIH** presentada por la Lda. NURIA SANCHEZ VEGA, para optar al Grado de Doctor, ha sido realizada bajo muestra dirección en el Hospital Clínico San Carlos y, considerándola concluida, autorizan su presentación a fin que pueda ser defendida ante el tribunal correspondiente.

Madrid, 20 de septiembre de 2018



Fdo: Dra. Dulcenombre Gómez Garre



Fdo: Dr. Vicente Estrada



# AGRADECIMIENTOS



A Vicente Estrada por haberme embarcado en este proyecto, por tu interés en la investigación, por tu profesionalidad y calidad humana.

A Maritina Gómez Garre por tu implicación, orientación y supervisión. Gracias por abrirme las puertas del laboratorio y brindarme generosamente tu apoyo.

A Elpido Calvo por hacer todo lo que estaba en tu mano para facilitarme el proceso.

A Adriana e Isabel Ortega, por estar siempre dispuestas a colaborar, sin vuestro esfuerzo y trabajo hubiera sido imposible realizar esta tesis.

A Manuel Fuentes por las horas compartidas en el análisis estadístico.

A todos los participantes, tanto los voluntarios control como los pacientes VIH, por vuestra disposición e interés en contribuir a la investigación.

A MSD, porque a veces de las situaciones más incompresibles surgen las oportunidades más interesantes. Gracias por la flexibilidad y buena disposición para que haya podido llevar a cabo esta investigación. En especial a Manuel Cotarelo, Oscar Rincon e Imma Clotet por su compañerismo, es un orgullo trabajar con vosotros diariamente.

A mis familiares y amigos, en especial a mi hermana por ser mi compañera, juntas podemos con todo. Y por supuesto a mi suegra Chelo por su apoyo absoluto y las innumerables horas de canguro.

A mis niños, Diego y Adriana, por hacerme entender la vida de otro modo, gracias por hacerme feliz.

A Antonio por su amor, paciencia y comprensión, eres el mejor compañero de viaje que puedo imaginar, contigo todo es mejor.

A mi madre por quererme, por apoyarme incondicionalmente, por educarme en la perseverancia y el esfuerzo diario. Ella es la verdadera artífice de que este trabajo se haya podido realizar. Mama, porque eres un ejemplo de fortaleza, superación, dedicación, y lo más importante eres aún mejor persona.





A mi madre

A Antonio

A Diego y Adriana



Parte de este este trabajo de investigación ha sido  
presentado en el congreso:

**“EACS, 16th European AIDS Conference”**

**25-27 de Octubre de 2017.**

**Milan, Italia.**



# 1. ÍNDICE



Clave de abreviaturas.

## 1. INTRODUCCIÓN

---

1.1	Generalidades del virus de la inmunodeficiencia humana.	1
1.2	Epidemiología del Virus de la inmunodeficiencia humana.	1
1.3	Paciente VIH y riesgo cardiovascular.	2
1.3.1	Epidemiología enfermedades cardiovasculares en PVVIH.	5
1.3.2	Ateroesclerosis en la infección por VIH.	7
1.3.2.1	Fisiopatología de la ateroesclerosis en la infección por VIH.	8
1.3.2.2	Población VIH y ateroesclerosis.	11
1.3.2.3	Ateroesclerosis subclínica y manifestaciones clínicas en PVVIH.	12
1.4	VIH y enfermedad renal.	14
1.4.1	Patogénesis de la nefropatía asociada al VIH.	15
1.4.2	Principales manifestaciones de enfermedad renal en PVVIH.	15
1.4.3	Toxicidad renal relacionada con el TAR.	17
1.5	Microbiota intestinal.	18



1.6	Trimetilamina (TMA) y el N-óxido de Trimetilamina (TMAO).	20
1.6.1	¿Qué son la TMA) y TMAO?	20
1.6.2	Principales precursores de TMA y TMAO.	21
1.6.3	Metabolismo para la producción TMA y TMAO.	22
1.6.3.1	Formación de Trimetilamina.	22
1.6.3.2	Formación de Trimetilamina N-Oxido.	24
1.6.4	Papel de la microbiota en la generación de TMAO.	25
1.6.5	Niveles de TMA y TMAO.	26
1.6.6	Determinaciones de TMAO/TMA en sangre.	28
1.7	Relación entre el TMAO y enfermedades.	28
1.7.1	TMAO y riesgo cardiovascular.	29
1.7.1.1	Origen de la asociación TMAO y riesgo cardiovascular.	30
1.7.1.2	Mecanismos de asociación del TMA y la aterosclerosis.	31
1.7.1.3	Evidencias de la asociación TMAO y riesgo cardiovascular.	33
1.7.2	TMAO y enfermedad renal.	37

**2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

---

2.1	Hipótesis.	45
2.2	Objetivos.	45

**3. MATERIAL Y MÉTODOS**

---

3.1	Diseño del estudio.	49
3.2	Población del estudio.	49
3.3	Obtención de muestras.	50
3.4	Medidas de variables bioquímicas.	50
3.5	Evaluación del riesgo cardiovascular.	52
	3.5.1 Medida del grosor íntima-media carotideo (GIMc).	52
3.6	Evaluación de la función renal.	53
3.7	Cuantificación de los metabolitos bacterianos.	54
	3.7.1 Protocolo de análisis de TMAO por LC/MS.	54
	3.7.1.1 Procesamiento de muestras TMAO.	54
	3.7.1.2 Condiciones cromatográficas y espectrométricas TMAO.	54

3.7.2	Protocolo de análisis de TMA mediante GC-MS.	55
3.7.2.1	Procesamiento de muestras TMA.	55
3.7.2.2	Condiciones cromatográficas y espectrométricas TMA.	56
3.8	Análisis estadístico.	57

#### **4. RESULTADOS**

---

4.1	Análisis descriptivo	61
4.2	Metabolitos de la microbiota intestinal en pacientes VIH.	64
4.3	Relación de TMAO y presencia de enfermedad cardiovascular, inflamación y enfermedad renal.	64
4.3.1	Relación de TMAO y la presencia de enfermedad cardiovascular.	66
4.3.2.	Relación de los niveles de TMAO con parámetros inflamatorios.	69
4.3.3.	Relación de TMAO y la presencia de enfermedad renal	69
4.3.4.	Análisis multivariado de la relación entre los niveles de TMAO y la enfermedad cardiovascular y renal.	73

4.4 Relación de TMA y la presencia de ECV, inflamación y enfermedad renal	74
4.4.1 Relación de TMA y la presencia de enfermedad cardiovascular.	76
4.4.2. Relación de los niveles de TMA con parámetros inflamatorios.	76
4.4.3. Relación de TMA Y la presencia de enfermedad renal.	77
4.3.4 Análisis multivariado de la relación entre los niveles de TMA y la enfermedad cardiovascular y renal.	77

## **5. DISCUSIÓN**

---

5.1 Relación de TMA y TMAO y la presencia de enfermedad cardiovascular.	81
5.2 Relación de los niveles de TMA y TMAO con parámetros inflamatorios.	85
5.3 Relación de TMA y TMAO y la presencia de enfermedad renal.	87
5.4 Fortalezas y limitaciones del estudio.	90

## **6. CONCLUSIONES**

---

6.1 Conclusiones.	95
-------------------	----

**7. RESUMEN**

---

7.1	Resumen.	99
7.2	Summary.	103

**8. ANEXOS**

---

8.1	Consentimiento informado.	109
8.2	Abstract.	113
8.3	Poster.	115

**9. BIBLIOGRAFÍA**

---

9.1	Bibliografía.	119
-----	---------------	-----





En algunos casos se ha conservado la correspondiente abreviatura en inglés por ser más frecuente su uso utilización en el lenguaje científico.

ACC, arteria carotida común

ACS, aterosclerosis carotidea subclínica

CDC, Clasificación del *Center for diseases classification*

CT, colesterol total

CT no HDL, colesterol no HDL

CAC, calcio de la arteria coronaria

CTA, angiografía coronaria por tomografía computarizada

CV, cardiovascular

EAC, enfermedad de arteria coronaria

ECV, enfermedad cardiovascular

ECVs, enfermedad cardiovascular subclínica

eGFR, estimated glomerular filtration rate

eFG, filtrado glomerular estimado

ERC, enfermedad renal crónica

ESRD, enfermedad renal en etapa terminal

FMO3, flavina monooxigenasa 3

FG, filtrado glomerular

FRCV, factores de riesgo cardiovascular tradicionales

FRS, Framingham risk score

GIMc, Grosor de intima-media carotidea

HDLc, Colesterol HDL

HOMA-R basal, *Homeostasis model assessment of insulin resistance*, índice indirecto de resistencia insulínica



HTA, hipertension arterial

IAM, infarto agudo de miocardio

IC 95%, intervalo de confianza al 95%

IM Infarto de miocardio

IMC, índice de masa corporal

INI, inhibidor de la integrasa

IRA, daño renal agudo

ITIAN, inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleosido

ITINAN, Inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleosido

IP, inhibidores de la proteasa

N, número de pacientes

LC-MS, cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas

LDLc, colesterol LDL

LPS, lipopolisacarido

NAVIH, nefropatía asociada al VIH

OR, odds ratio

PC, fosfatidilcolina

usPCR, Proteína C reactiva ultrasensible

PVVIH, pacientes que viven con VIH

TAR, Tratamiento antirretroviral

TMA, Trimetilamina.

TMAO, Trimetilamina N oxido

TG, Triglicéridos

VACS-Veterans Aging Cohort Study

VIH, Virus de inmunodeficiencia humana

# 1. INTRODUCCIÓN



### 1.1 **Generalidades del virus de la inmunodeficiencia humana.**

En los últimos años se han producido avances importantes en la lucha contra el virus de la inmunodeficiencia humana que hacen pensar en la posibilidad de controlar la epidemia. Los avances en la terapia antiretroviral (TAR) han transformado la infección por VIH en una enfermedad crónica y manejable. En la actualidad existen fármacos muy potentes, eficaces, excelentemente tolerados y de posología sencilla con los que se controla la replicación viral y se reduce la transmisión de la infección (Gutierrez, 2017).

A nivel global, en los últimos años se ha duplicado el acceso al TAR y se ha reducido la incidencia de nuevas infecciones. Más de 18 millones de personas que viven con VIH (PVVIH) reciben TAR pero todavía un número similar continúa sin acceso al tratamiento y la mayoría desconoce su estado serológico, aproximadamente el 40% de PVVIH (UNAIDS 2018).

Las grandes inversiones en los últimos 15 años han tenido una gran repercusión consiguiéndose reducciones en la mortalidad del 48% (Gutierrez 2017, UNAIDS 2018, WHO 2018). A pesar de los notables avances para terminar con la epidemia es necesario continuar con la aplicación de medidas durante los próximos años y con este objetivo la OMS ha marcado la estrategia 90-90-90: 90% de personas diagnosticadas, 90% de personas en tratamiento y 90% con carga viral indetectable. (UNAIDS 2018).

### 1.2 **Epidemiología del Virus de la inmunodeficiencia humana.**

Desde el comienzo de la epidemia 76,1 millones de personas se han infectado con VIH y 35 millones han fallecido a causa de enfermedades relacionadas con el SIDA. En 2016 a nivel mundial había 36,7 millones de PVVIH, 20.9 millones tenían acceso al TAR y se notificaron 1,8 millones de nuevos casos. Afortunadamente, las muertes relacionadas con el SIDA continúan disminuyendo, un 48% desde las máximas registradas en 2005. En América del Norte, Europa occidental y central, en 2016 había 2,1 millones de PVVIH, 73.000 nuevas infecciones y 18.000 muertes por causas relacionadas con SIDA. Entre 2010 y 2016, el número de muertes relacionadas con el SIDA en la región descendió en un 32% (UNAIDS 2017).

En España la tasa global de nuevos diagnósticos es similar a otros países europeos, desde el inicio de la epidemia se han notificado 86663 casos de SIDA y 3353 nuevos diagnósticos. De estos nuevos diagnósticos un 83,9% fueron hombres, con 36 años de media, encontrándose la mayoría entre 30 y 39 años (33,6%). El 46,0% de los nuevos diagnósticos fueron diagnósticos tardíos siendo mayor en mujeres (54,1% frente a 44,6%) y aumentado con la edad, pasando de un 1,7% en los casos de 15 a 19 años, hasta un 51,1% en los mayores de 49 años. La mediana de CD4 fue de 376 cel/mL. En cuanto al modo de transmisión, el 79% de los nuevos diagnósticos fueron por transmisión sexual, siendo más frecuente en hombres que mantiene sexo con hombres (HSH) (53,1%), seguida de la transmisión heterosexual (26,5%) y la ocurrida en personas que se inyectan drogas (PID) (3,6%). La incidencia de SIDA se ha reducido drásticamente gracias a la aparición del TAR, siendo en los años 90 fue cuando se registró el mayor número de casos notificados para luego descender progresivamente. En el año 2007, se notificaron 412 casos de SIDA (Registro nacional de SIDA, 2018).

En la comunidad de Madrid, se han registrado 11071 nuevos diagnósticos de VIH desde el 2004 en concreto durante el 2016 se diagnosticaron 409 nuevos casos siendo un 60,6% por transmisión HSH, un 26,2% heterosexual y un 2% PID. (Registro nacional de SIDA, 2018)

### **1.3 Paciente VIH y riesgo cardiovascular**

Actualmente en la población general las enfermedades circulatorias son la primera causa de muerte representando el 29,2% del total de fallecimientos, situándolas por encima del cáncer (27,8%) (INE, 2014). La PVVIH presenta menor supervivencia que la población general pero la aparición del TAR ha mejorado la calidad de vida, ha disminuido drásticamente la mortalidad, aumentando la supervivencia casi al mismo nivel (Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration, 2008). Se calcula que cuando un paciente lleva más de 5 años en TAR con recuperación inmunológica, las tasas de supervivencia se equiparan a las de la población general (Bhaskaran, 2008).

En PVVIH las infecciones oportunistas y el SIDA continúan siendo las principales causas de mortalidad. Han descendido notablemente mientras que otras complicaciones como hepatopatías, neoplasias y eventos cardiovasculares han tomado mayor relevancia. Al aumentar la esperanza de vida las comorbilidades asociadas al envejecimiento aparecen con mayor frecuencia siendo la ECV una de las más prevalentes en PVVIH (Sackoff, 2006, Martinez, 2007, Lewden, 2008). El origen se debe a diversos aspectos: genética, factores de riesgo cardiovascular (FRCV), posible acción directa de antiretrovirales y parámetros relacionados con el propio VIH, como son la inflamación crónica y la inmunodeficiencia, incluso en pacientes controlados inmunovirologicamente (Kaplan-Lewis, 2016; Ballocca, 2016; d’Ettorre2016). La inflamación crónica y la activación inmune persistente podrían proceder de la replicación viral a bajo nivel lo que podría impulsar el envejecimiento prematuro del sistema cardiovascular (d’Ettorre, 2016) (ver figura 1.1)

Los FRCV son más habituales en PVVIH que en población general y desempeñan un papel clave en el desarrollo de ECV dado que la patogénesis puede verse acelerada al combinar los efectos de TAR y de la infección por VIH (Glass, 2006). Numerosos estudios apuntan a que el consumo de tabaco es mayor en PVVIH lo que conlleva a tasas más elevadas de enfermedad pulmonar y cardiovascular, con 2 veces mayor riesgo de IM en pacientes fumadores con VIH (Crothers, 2005). En los estudios SMART y el estudio D:A:D las tasas de tabaquismo descritas fueron altas, siendo de un 40,5% y un 51,5% respectivamente (Lifson, 2010; Friis-Møller, 2003).

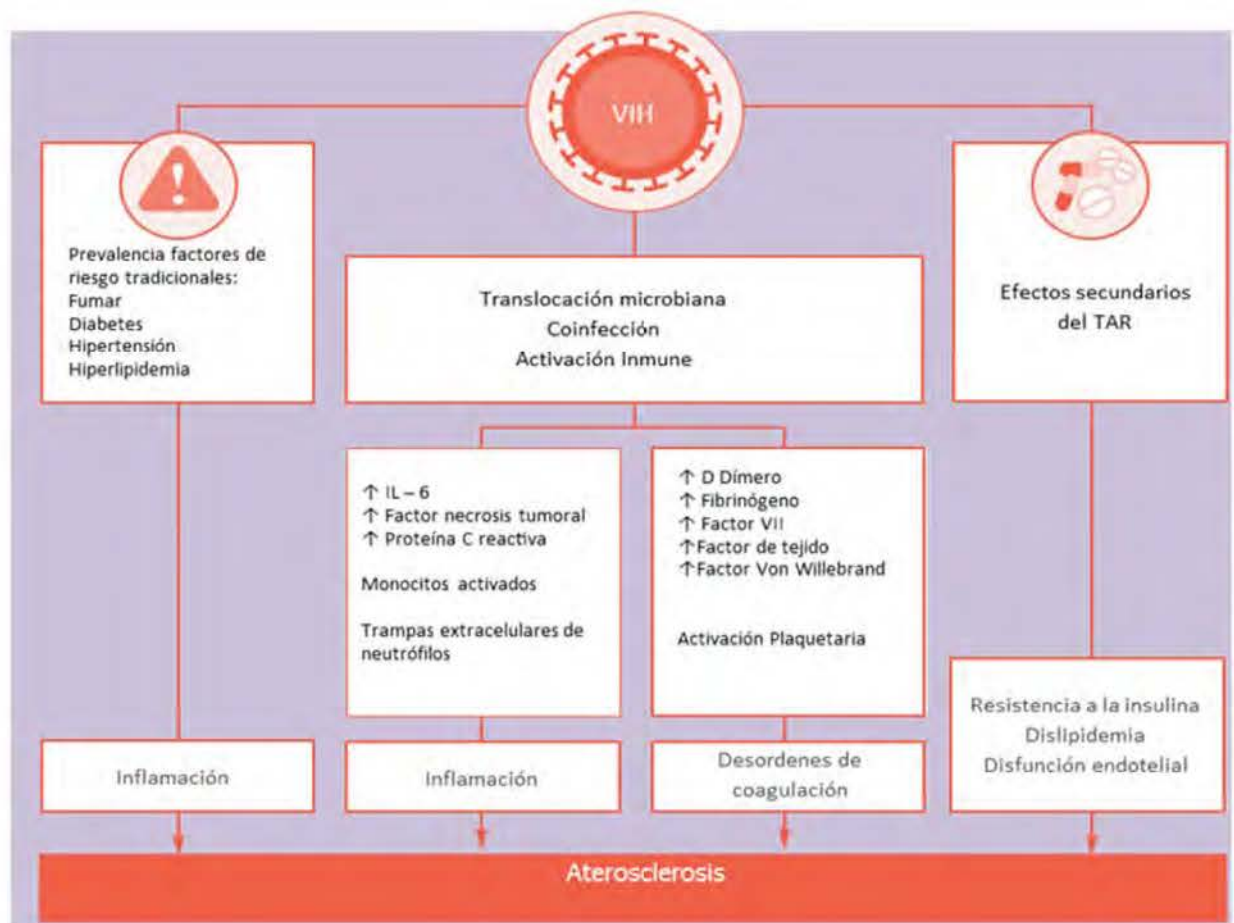
La diabetes mellitus (DM), dislipidemia y la hipertensión son más frecuentes en PVVIH. La cohorte MACS (Multicenter AIDS Cohort Study), mostró que la incidencia de DM en varones recibiendo TAR fue cuatro veces mayor a la de hombres seronegativos (Brown, 2005). La dislipemia en PVVIH presenta prevalencias de hasta el 80 % incluso antes de que comiencen el TAR (Troll, 2011; Nduka, 2015) y la desarrollada durante el TAR se caracteriza por un perfil lipídico proaterogénico, con incrementos en los niveles de triglicéridos, colesterol total, LDL colesterol y manteniendo estables o reduciendo los niveles de HDL (Duprez, 2009; Baker, 2010).

Los efectos del TAR varían en función de las diferentes familias de antiretrovirales. Con los fármacos más antiguos, especialmente de los inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa (ITINAN) e inhibidores de la proteasa (IP), la

toxicidad era más frecuente (Calza, 2003). Con fármacos más recientes, inhibidores de la integrasa (INI) (Dolutegravir, Elvitegravir y Raltegravir) y nuevos ITINAN (Rilpivirina) los efectos se han atenuado y la aparición de toxicidad es menos frecuente aunque no se ha eliminado por completo.

La prevalencia de hipertensión es alta en PVVIH oscilando entre el 20% y el 40% en los países de mayores ingresos y del 11-28% en los países con ingresos más bajos lo que da una idea de la tendencia de distribución del riesgo en diferentes regiones del mundo (Krauskopf, 2013; Chu, 2011, Bloomfield, 2011; Mateen, 2013).

Las PVVIH con más frecuencia presentan alteraciones en la composición corporal; estas podrían estar relacionadas con el TAR (anulación grasa abdominal y pérdida de grasa subcutánea). Al igual que en la población general, la obesidad es altamente prevalente y está directamente relacionada a la grasa visceral y enfermedades metabólicas (Lake, 2017; Freitas, 2014).



**Figura 1.1 Patogénesis de la enfermedad cardiovascular asociada al VIH. Vachlat, 2017**

### **1.3.1 Epidemiología de enfermedades cardiovasculares (ECV) en pacientes VIH.**

Las ECV son la principal causa de morbilidad y mortalidad en el mundo. En PVVIH son la segunda causa de mortalidad en EEUU y la tercera en Europa (Smith, 2014), siendo la incidencia de enfermedad coronaria mayor que en personas no infectadas y apareciendo a edades más jóvenes, (Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration, 2010). Se han ido modificando en paralelo a los avances en el tratamiento, desde la aparición del TAR el riesgo de sufrir complicaciones asociadas a la aterosclerosis, incluyendo accidente cerebrovascular, IM e insuficiencia cardíaca es mayor (Vachiat, 2017). Aunque la presentación clínica de las ECV es muy diversa, la principal es la disfunción arterial coronaria presentándose habitualmente como síndrome coronario agudo (Triant, 2007). También se ha descrito mayor prevalencia de placas ateroscleróticas de alto riesgo más propensas a desestabilizarse (D'Ascenzo, 2012).

En la cohorte de veteranos (VACS-Veterans Aging Cohort Study) se analizaron datos de 82,459 veteranos durante 5,9 años y observaron un riesgo significativamente mayor de IAM en los PVVIH frente a los no VIH (HR: 1.48) incluso tras ajustar por FRS, comorbilidades y uso de otros fármacos. El riesgo más elevado fue en pacientes en TAR con cargas virales bajas (VIH-ARN < 500 copias/ml) y con recuento de CD4 inferior a 200 cell/mL (Freiberg, 2013). Se ajustó por la presencia o ausencia de FRCV y los veteranos sin FRCV e infectados presentaron un riesgo 2 veces mayor de IAM frente a los no infectados aumentando el riesgo rápidamente con cada factor de riesgo adicional añadido (Paisible, 2015). En otra cohorte de pacientes que reclutó 22.081 seropositivos y 230.069 controles se observó un mayor riesgo de IAM en PVVIH con linfocitos CD4 bajos o con un nadir de CD4 inferior a 200 células/ml (Silverberg, 2014).

Los estudios de aterosclerosis subclínica (ACS) van en la misma línea mostrando un mayor riesgo de ECV en PVVIH. Se midió el GIMc en 148 PVVIH y controles pareados por sexo observando que en los PVVIH fue significativamente superior y progresaba más rápido que en controles. La infección por VIH resultó ser predictor de GIMc independiente del resto de factores de riesgo como edad, sexo, tabaquismo, hipertensión arterial, anomalías lipídicas y diabetes mellitus. El nadir de CD4 <200 células/ml se asoció a progresión de GIMc (Hsue, 2014).



Los estudios epidemiológicos muestran un impacto global significativo del VIH en las ECV, resumimos los más relevantes en la siguiente tabla 1.1:

**Tabla 1.1 Resumen estudios epidemiológicos que evalúan el impacto del VIH en la ECV**

Autor	Pacientes	FUP	Resultados
Tseng, 2012	860 VIH	3.7	Objetivo incidencia de MCR: De 230 muertes, el 13% cumplió con los criterios de SCD las MCR fueron el 86% de todas las muertes cardíacas (30 de 35) Tasa media de MCR: 2.6 por 1000 años-persona (IC 95% 1.8-3.8), 4.5 veces más alto de lo esperado.
Esser, 2013	803 VIH	NA	Prevalencia de ECV: 10.1% (IC 95% 8.0-12.2%); PVVIH≥45 años mostraron tasas aumentadas significativamente de ECV, EAC (7.5 vs. 1.8%, $p < 0.001$ ); IM (6.0 vs 1.8%, $p = 0.002$ ); EAP (4.6 vs. 1.5%, $p < 0.017$ ). Significativamente asociado con prevalencia de ECV en multivariable: Edad (OR 2.05, IC95% 1.64-2.56), Fumar (OR 5.96 $xd$ , IC95% 2.31-15.38) Infección por VIH sintomática avanzada (OR 2.60, IC95% 1.31-5.15)
Freiberg, 2013	82459: 27350 VIH+ 55109 VIH-	5.9	Aumento del riesgo de IM en PVVIH en la cohorte VACS-VS (HR: 1.48; IC95% 1.27-1.72)
Womack, 2014	2187; 32% VIH+	6	Aumento riesgo ECV en mujeres VIH vs no infectadas (HR: 2.8; IC95%:1.7-4.6)
Paisible, 2015	81322; 33% VIH	5.9	VIH+ veteranos sin FRCV presentaron un riesgo 2 veces mayor de IM en comparación con los veteranos VIH- sin factores de riesgo de ECV. (HR: 2.0; IC95%: 1.0- 3.9)
Triant, 2007	3851 VIH+ 104589 VIH-	8	Aumento del riesgo de IM en los pacientes VIH (RR: 1.75; $P < 0.0001$ )
Petoumenos, 2014	24,323 VIH+	NA	Tasas de eventos de IM, EAC y CVD por cada 1000 personas/año aumentaron de 2.29, 3.11 y 3.65 en las personas de 40-45 años a 6.53, 11.91 y 15.89 en las personas de 60-65 años, respectivamente.
Silverberg, 2014	22081 VIH+ 23069 VIH	13	Mayor riesgo de IM en VIH+ con bajos CD4 o nadir ( $< 200$ ) comparado con VIH- (RR, 1.76; 95%CI: 1.31-2.37 para bajo CD4 RR, 1.74; 95%CI: 1.47-2.06 para bajo nadir CD4)
Lang, 2010	74958 VIH+	6	El riesgo de IM fue mayor en VIH+ vs la población general: 1.4 (IC95%:1.3-1.6) para hombres VIH+ y 2.7 (IC95% 1.8 -3.9) para mujeres VIH+ frente población general.
Carballo, 2015	133 VIH y 5328 VIH-	1	Se incluyeron pacientes que sobrevivieron a un IM ocurrido a partir del 1/1/2005. VIH asociado a un riesgo significativamente mayor de mortalidad por todas las causas 1 año después de IM sin incidencia significativa (4 [3.0%] VIH+ y 146 [3.0%] VIH-, $o$ 1.16, IC95% 0.41-3.27)
Hsue, 2004	148 VIH+ 63 VIH-	1	Mayor GIMc basal en VIH+ ( $P = 0.0001$ ) y progresión más rápida ( $P = 0.002$ )
Currier, 2007	133 pacientes 45 triadas+	3	El VIH y el uso de IP no contribuyen a la progresión del GIMc. La mediana de la diferencia de pares en el cambio GIM entre pacientes con IP y sin IP no fue estadísticamente significativa ( $P = 0,19$ ). Cuando se combinaron los grupos VIH+ y se compararon con el grupo VIH-, la diferencia en la progresión tampoco fue significativa ( $P = 0,71$ )
Post, 2014	618VIH+ 383VIH-	NA	Varones VIH+ mayor prevalencia de CAC [PR: 1.21 (IC95%: 1.08); $P = 0.001$ ] y de cualquier tipo de placa [PR: 1.14 (IC: 1.05- 1.24); $P = 0.001$ ], incluyendo no calcificada [PR: 1.28 (IC: 1.13-1.45); $P < 0.001$ ] y placa mixta [PR: 1.35 (IC: 1.10-1.65); $P = 0.004$ ] que varones no infectados.
Klein, 2015	95687; 31% VIH+	15	Disminución IM ajustado por VIH a lo largo del tiempo, alcanzando 1 (IC95%:7-1.4) en 2010-11.

\*Cada tríada consistió en un sujeto de cada una de las siguientes categorías: (1) VIH + con tratamiento IP; (2) VIH + sin uso previo de IP; (3) VIH-sujeto. NA: No aplica; VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana; GIM: Intima-media espesor; IM: infarto de miocardio; PR: Ratio de prevalencia; ECV: Enfermedad cardiovascular; EAP enfermedades arteriales periféricas ;CAC: calcio arterial coronario : MCR muerte cardíaca repentina ;IC intervalo de confianza: FUP: seguimiento (años)

Estas evidencias avalan el consenso general de que hay una mayor incidencia de enfermedad cardiovascular clínica y mayor prevalencia de aterosclerosis subclínica en PVVIH; lo que apoyaría la idea de que la infección por VIH es un factor de riesgo independiente para la enfermedad cardiovascular.

### **1.3.2 Aterosclerosis en la infección por VIH**

La aterosclerosis causa de la mayoría de las ECV, es más común en hombres y se suele empezar a manifestar clínicamente en personas mayores de 45 años (Lozano, 2012). La aterosclerosis subclínica (ACS) se define como la fase asintomática o preclínica de la aterosclerosis. En la actualidad la identificación preclínica de los pacientes de alto riesgo se basa en la evaluación de riesgos utilizando sistemas de puntuación de los factores de riesgo cardiovascular (Berger, 2010). Sin embargo, su utilización en la práctica clínica es baja y los factores de riesgo por sí solos no pueden identificar de manera concluyente quien tiene mayor riesgo de desarrollar manifestaciones clínicas de ECV. Por esta razón se han incorporado las pruebas no invasivas como indicadores de aterosclerosis asintomática, como el índice tobillo-brazo (ITB), el calcio de la arteria coronaria (CAC), el grosor íntima media de la arteria carótida (GIMc) y las pruebas de imagen electrocardiográficas (Akosah, 2003).

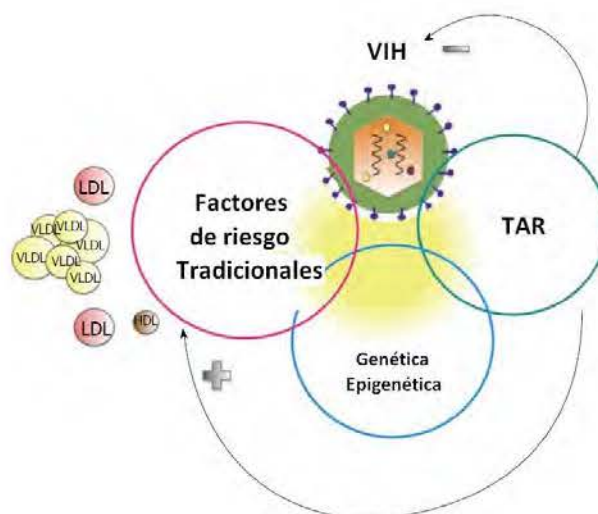
El GIMc medido mediante ultrasonografía B-mode, es un marcador de la ACS. Es una prueba no invasiva, fiable, reproducible y de bajo coste, se utiliza como marcador de progresión o regresión de enfermedad debido a su asociación con diversos factores de riesgo cardiovascular (Berger, 2010; Nezu, 2016; Berenson, 1998, Juonala 2010). Un GIMc elevado está asociado a mayor riesgo de cardiopatía isquémica y accidente cerebrovascular. En 5858 personas de 65 años o más sin antecedentes de ECV se midió el GIMc y se asoció con mayor riesgo de IM y accidente cerebrovascular (O'Leary, 1999; Heunten, 2008). En algunas series ha demostrado predecir eventos coronarios fatales. El estudio EDUCATE analizó el GIMc prospectivamente a 253 jóvenes de mediana edad y se observó que la aterosclerosis carotídea se asocia con enfermedad arterial coronaria severa y eventos futuros. Y la ecografía carotídea negativa se asoció con un excelente pronóstico (Akosah, 2007).

Los valores del GIMc dependen de la edad, género y raza y para establecer la normalidad o anormalidad del valor del GIMc es necesario compararlo con la población de referencia. Un GIMc por encima del percentil 75 de la población de referencia se considera patológico e indica la presencia de ACS avanzada (Devine, 2006; AHA, 2007). Presenta algunas limitaciones, entre las que destaca ser operador-dependiente; sin embargo, la utilización del GIM en la estratificación del RCV puede ayudar a identificar pacientes asintomáticos de alto riesgo cardiovascular con el objetivo de plantear estrategias de prevención cardiovascular más adecuadas.

### 1.3.2.1 Fisiopatología de la aterosclerosis en la infección por VIH.

La fisiopatología de la aterosclerosis asociada al virus del VIH es compleja y de origen multifactorial: la alta prevalencia de FRCV, la infección por el VIH per se, efectos secundarios derivados de un TAR potencialmente tóxico a largo plazo, factores genéticos y epigenéticos (todavía no bien conocidos) pueden aumentar el riesgo de padecer ECV (Pinto, 2017).

La infección por el VIH puede contribuir directamente (activación inmune e inflamación) como indirectamente a través de la inmunodeficiencia que provoca el virus. El efecto del TAR es difícil de evaluar puesto que por un lado la supresión de la replicación viral puede ejercer un efecto positivo (la posible actividad antiaterosclerótica) mientras que por otro están los efectos secundarios a ciertos TAR pudiendo promover la aterosclerosis (efecto negativo) (ver figura 1.2) (Vachiat, 2017).



**Figura 1.2 Fisiopatología del VIH asociada a la aterosclerosis. Shahbaz, 2015.**

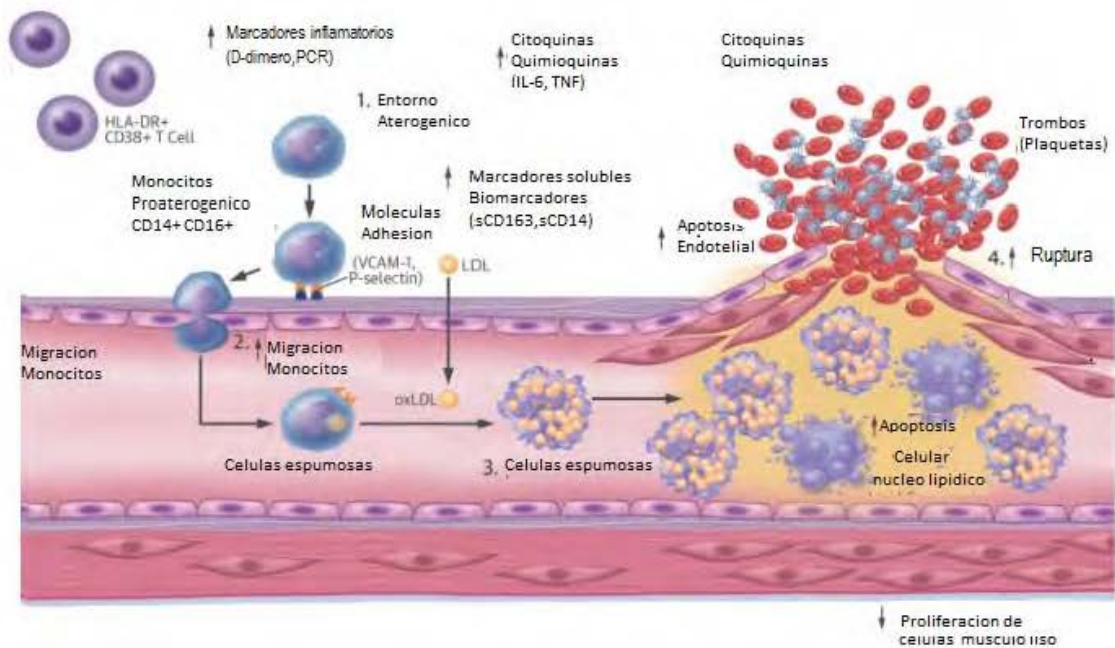


En PVVIH, la fisiopatología del desarrollo de la lesión ateromatosa, presenta unas características histológicas que difieren de la observada en la población general. La infección con VIH se asocia con un aumento en la inflamación sistémica, daño al endotelio vascular y está estrechamente relacionada con la capacidad del virus para provocar la activación endotelial, aumentar su permeabilidad y producir apoptosis (*Gibellini, 2013*). Podemos esquematizar los procesos biológicos secuenciales que conducen a la progresión acelerada de la aterosclerosis en tres bloques:

1. Inflamación que conduce al reclutamiento de monocitos;
2. Migración de monocitos al endotelio y diferenciación a macrófagos y células espumosas;
3. Transformación de células espumosas sufriendo apoptosis debido al estrés del retículo endoplásmico (ER) dependiente de calcio.

Estos mecanismos se ven afectados cuando el VIH interactúa con genes reguladores involucrados en cualquiera de los 3 pasos. En las primeras fases de la aterogénesis la disfunción endotelial se percibe como la incapacidad del revestimiento vascular para mantener la homeostasis. La disfunción endotelial induce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y moléculas de adhesión que propagan la respuesta inflamatoria, atrayendo monocitos y células T (*Wang, 2015; Gibellini 2012*). Un endotelio dañado facilita la entrada en el espacio subendotelial de lípidos plasmáticos (LDL) donde se oxidan por la alta concentración en radicales libres (LDLox). Las LDLox pasan a la íntima de la pared arterial favoreciendo la exposición a la proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1), que promueve el reclutamiento de leucocitos circulantes (monocitos) (*Giannarelli 2011; Bittencourt, 2015; Gibellini, 2013*).

Una vez en la íntima, los leucocitos fagocitan las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL), formando células espumosas (*Conte, 2013; Shrestha 2014*) que liberan citoquinas inflamatorias como: TNF- $\alpha$ , interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (*d'Ettorre, 2010*), interleuquina-1 (IL-1), IL-6 e interleuquina-8 (IL-8) (*Fisher 2011*), así como moléculas de adhesión vascular-1 (VCAM-1), molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), E-selectina y factor von Willebrand (vWF) (*Arildsen 2013; Gresele 2012; Fisher, 2011*). (Ver figura 1.3). Además de las células espumosas se puede producir la formación de placas las cuales pueden fragmentarse y derivar en accidente cerebrovascular, IM y trombosis.



**Figura 1.3 Principales actores celulares en la aterosclerosis asociada a VIH. Kearns, 2017**

En el proceso ateroesclerótico asociado a la infección por VIH los macrófagos juegan un papel clave en el proceso inflamatorio y la formación de placa (Crowe, 2010). A pesar de que las células T son el mayor reservorio en la infección por VIH, los monocitos y los macrófagos también apoyan la replicación, permaneciendo crónicamente infectados. La infección por VIH persiste aunque los pacientes estén en TAR, el virus permanece latente en células T, monocitos/macrófagos, donde se integra en el genoma del huésped reapareciendo cuando se discontinúa el tratamiento (Klatt, 2013). Incluso en fase de latencia, las células T y monocitos pueden producir proteínas virales a bajo nivel y pueden alterar su función (Crowe, 2010; Shah, 2018).

La infección por VIH activa una serie de vías celulares y mecanismos moleculares que hacen que un macrófago infectado contribuya a la aterogénesis: aumento del estrés oxidativo y del retículo endoplásmico; aumento de la activación, formación de inflamasomas, producción de citoquinas y disminución de la autofagia. Estos mecanismos moleculares se amplifican entre sí y se hacen más complejos con el TAR, factores de riesgo asociados al VIH y las comorbilidades (Kearns, 2017).

### 1.3.2.2 Población VIH y aterosclerosis.

Las ECV, incluyendo la aterosclerosis y las complicaciones asociadas son una causa creciente de morbimortalidad en PVVIH, de hecho actualmente la ECV asociada a la aterosclerosis, incluyendo IM y el accidente cerebrovascular son algunas de las principales causas de mortalidad (Vachiat, 2017; D'Ascenzo 2012 y 2015; Gili, 2016; Smith 2014). El riesgo de padecer aterosclerosis en comparación con la población no infectada de las mismas características es mayor y los FRCV como hipertensión, diabetes y dislipemia son en general más prevalentes. A pesar de un control adecuado de la replicación del VIH, los PVVIH poseen un riesgo de 1,5 a 3 veces mayor de desarrollar ECV (Triant, 2007; Freiberg, 2013; Zanni, 2014).

Estudios de cohortes han mostrado tasas más elevadas de IAM o cardiopatía isquémica, con un mayor riesgo oscilando entre un 75–200% de más riesgo en PVVIH (Llarrouse, 2010) Estudios de casos y controles también han reflejado mayor prevalencia de arteriosclerosis, aumento de anomalías cardíacas subclínicas, aumento del GIMc, mayor afectación vascular periférica, y mayor disfunción endotelial (Larrousse 2010).

Hay dos ensayos clínicos cuya información ha aportado datos clave en el conocimiento de la relación del TAR con la ECV: El estudio SMART (Strategies for Management of Antiretroviral Therapy) y el estudio START (Strategic Timing of Antiretroviral Treatment). El SMART mostró que el TAR en pacientes con recuentos de células CD4<350/ml disminuía eventos adversos relacionados con SIDA y eventos de ECV. En aquellos que aplazaron o interrumpían el TAR el riesgo de eventos cardiovasculares aumento el 70%, sugiriendo que es necesario continuar con el tratamiento para prevenir la inflamación crónica asociada al VIH y mitigar el riesgo de ECV (SMART Study Group, 2006). El START mostro una reducción del 40% en eventos SIDA en el brazo de tratamiento que recibía TAR inmediatamente, pero no se asoció a una reducción en los eventos de ECV (INSIGHT START Study Group 2015).

Los estudios SMART y START respaldan el uso del TAR en base a recuentos de CD4 más elevados lo que derivaría en una disminución de las tasas de ECV, pero el TAR por sí solo no es suficiente para prevenir el riesgo de ECV. En controladores de elite, indetectables y sin recibir TAR, aumenta tanto la aterosclerosis como la

activación inmune, incluyendo elevación de CD163 soluble en plasma (Pereyra, 2012). El GIMc fue mayor que en no infectados, incluso tras ajustar por los FRCV por lo que parece evidente el papel que juega la inflamación, y no el TAR o el propio virus, en la ECV asociada al VIH (Hsue, 2009).

### **1.3.2.3 Aterosclerosis carotídea subclínica (ACS) y manifestaciones clínicas.**

Clínicamente, casi todos los tipos de enfermedades cardíacas han sido detectadas en PVVIH siendo la enfermedad de arteria coronaria (EAC) la más prevalente. Sus manifestaciones clínicas van desde isquemia silente a síndromes coronarios agudos. En población general la presencia de placas no calcificadas detectadas por angiografía coronaria por tomografía computarizada (CTA) se asocia con mayores tasas de síndrome coronario agudo cuando se compara con placas mixtas y calcificadas (D'Ascenzo, 2015; Lo, 2010; Post, 2014)

En las PVVIH las características de la placa son en general diferentes a las observadas en población general. Es mayor la frecuencia de placas no calcificadas, que se considera representan una etapa temprana de la aterosclerosis, y son más propensas a la ruptura y a la formación de trombos en comparación con las placas calcificadas (D'Ascenzo, 2015; Post, 2014). En pacientes bien controlados, los estudios muestran mayor prevalencia de aterosclerosis coronaria subclínica y mayor carga de placa aterosclerótica coronaria, en particular placas inflamatorias no calcificadas, en varones con VIH (Lo, 2010). Hombres y mujeres infectados por VIH tienen significativamente mayores porcentajes de segmentos con placa no calcificada (74% vs. 23%) comparado con la población control (Fitch, 2013).

La presencia de placas de alto riesgo sobretodo se asociada a un incremento de la activación inmune. Las placas son más inestables, están más predispuestas a la ruptura (D'Ascenzo, 2015). En los PVVIH hay mayor prevalencia de características de placa de alta vulnerabilidad (como baja atenuación, remodelación positiva y calcificación irregular). En un estudio de despistaje de ACS mediante angio-CT, un tercio de los 108 pacientes PVVIH sin ECV conocida, presentaron mayor placa de



baja atenuación (22,8% frente a 7,3%), placa remodelada positivamente (49,5% vs. 31,7%) y placa de alto riesgo (7,9% frente a 0%) (Zanni, 2013).

Los estudios de despistaje de ACS por técnicas no invasivas, como GIMc y la angiografía por tomografía computarizada coronaria (CTA), indican una mayor prevalencia de ACS con PVVIH en comparación con pacientes sin VIH (Hulten, 2009; D'Ascenzo 2015; Stein, 2014). Ya desde la niñez, los niños con VIH que reciben TAR muestran un aumento del GIMc, lo que sugiere que el riesgo de padecer enfermedad coronaria puede estar elevado desde temprana edad (McComsey 2007).

El calcio de la arteria coronaria (CAC) ha demostrado mejorar la capacidad predictiva de los FRCV para la predicción de eventos en la población general pero hasta la fecha no se ha demostrado que sea tan útil en PVVIH (Stone, 2013). Hulten et al describieron una prevalencia similar de CAC entre PVVIH y no infectados (OR: 0,95, P=0,851). En la cohorte MACS, entre 450 hombres infectados con VIH y 309 controles, después de ajustar por los FRCV, la infección por VIH se asoció con la presencia de placa no calcificada fue de 1,31 (IC del 95%: 10,7-1,61) (Metkus, 2015).

Otro metanálisis que incluía 1.229 PVVIH en TAR mostró una prevalencia 3 veces mayor de placas de arterias coronarias no calcificadas (placas vulnerables) en CTA, comparando con controles sin VIH. Los pacientes con bajos recuentos de células CD4 tenían placas más vulnerables, por lo que la gravedad de la enfermedad parece puede contribuir a mayor riesgo de ECV (D'Ascenzo, 2015). Esta asociación a peores parámetros inmunoviroológicos sugiere que la inflamación sistémica y la activación inmune contribuyen a la aterogénesis acelerada y a la inestabilidad CV.

Los estudios mediante glucosa marcada y PET (tomografía por emisión de positrones) para detectar inflamación crónica han mostrado resultados muy llamativos en PVVIH. Subramanian et al compararon 27 PVVIH en TAR sin ECV previa, con dos grupos control no VIH: La inflamación en la pared aórtica fue similar entre pacientes VIH y controles ateroscleróticos sin VIH pero fue más alta que en los controles no infectados emparejados por FRS. En PVVIH, la inflamación de la pared aórtica se asoció con niveles de sCD163 (p=0.04) pero no con la proteína C-reactiva (p=0.65) o el dímero D (p=0.08) (Subramanian, 2012).



### 1.4 VIH y enfermedad renal.

Desde los inicios de la epidemia se identificaron enfermedades renales directamente asociadas al VIH (Fabian, 2009), la enfermedad renal es una complicación frecuente en PVVIH, apareciendo en un 3.5–48.5% (Naicker, 2015). Gracias a los avances terapéuticos logrados en estos años, las enfermedades renales asociadas al VIH se han modificado, tanto en incidencia como en tipo como en gravedad. La enfermedad renal clásica relacionada con el VIH es la nefropatía asociada al VIH (NAVIH), actualmente es poco prevalente por el uso del TAR.

La función renal disminuye con la edad ya que es uno de los procesos más frecuentemente vinculados al envejecimiento. En PVVIH la aparición de enfermedad renal se ve favorecida por la mayor longevidad, la mayor prevalencia de enfermedades metabólicas, la acumulación de riesgo cardiovascular y el tratamiento prolongado con determinados tratamientos (Kooman, 2017; Nadkarni, 2014; Lake, 2013; Calvo; 2014). El deterioro de la función renal es con frecuencia clínicamente asintomático por lo que su evaluación se realiza mediante determinaciones analíticas que permitan diagnosticar nefropatías en fases tempranas permitiendo así su adecuado control y tratamiento.

En estudios realizados en EEUU se ha observado que la incidencia de ERC aumenta 11 veces en personas con edad comprendida entre 60-69 años en comparación con las de 40 años y la tasa de incidencia sigue siendo desproporcionalmente mayor en raza negra que en blanca. Esta diferencia se extiende también a la incidencia de enfermedad renal en fase terminal (ESRD) (Abraham, 2015). La diferencia racial puede deberse en parte al gen APOL1 que se ha asociado al NAVIH y a la progresión de ERC en pacientes de ascendencia africana (Fine, 2012; Kopp, 2011; Kasembli, 2015; Parsa, 2013).

La Cohorte Multicéntrica del SIDA (MACS) analizó muestras de sangre y orina de 2.381 personas entre los años 2003 y 2014. Tras 11 años de seguimiento, la función renal disminuyó más rápido en hombres con VIH que en no infectados, perdiendo el doble de función renal por año de seguimiento (aunque nunca la pérdida fue superior al 1% anual). El filtrado glomerular (eFG) disminuyó una mediana del 0,3% anual en hombres sin VIH y del 0,8% anual en hombres con VIH. La proteinuria

fue 7 veces más común en pacientes en TAR que la observada en hombres sin VIH. El uso prolongado de tenofovir disoproxil fumarato (TDF) se correlacionó con la reducción de la función renal a corto plazo. Tener 60 años o más aumentó en un 50% la probabilidad de sufrir disminución de la función renal y la proteinuria incrementó dicho riesgo en un 80% (Palella, 2018).

El riñón es un órgano muy vascularizado y su función proporciona una idea general de la salud vascular. Independientemente de la terapia específica que se emplee para el riñón, la presencia de enfermedad renal debería hacer aconsejable una evaluación tanto del perfil de riesgo cardiovascular como del TAR que está recibiendo el paciente.

### **1.4.1 Patogénesis de la nefropatía asociada al VIH.**

La patogénesis de la nefropatía asociada al VIH es compleja y está mediada por diferentes factores como son el huésped, los factores ambientales, características del patógeno y el acceso a la terapia antirretroviral. Los factores de riesgo clásicos para el desarrollo de enfermedad renal son la edad avanzada, la raza negra y el bajo peso corporal. Existen factores propios del VIH como la replicación viral persistente, recuentos bajos de linfocitos CD4 y diagnóstico previo de SIDA que incrementan el riesgo de padecer enfermedad renal. También influyen la hipertensión arterial, la DM y la infección por VHB o VHC. Por último la medicación, los pacientes en tratamiento con TDF o con otros fármacos nefrotóxicos poseen un mayor riesgo (GESIDA, 2018). Todavía no está claramente definido cómo el VIH entra en las células del riñón. Dada la falta de CD4 y receptores de quimioquinas, necesarias para entrar en las células, la replicación viral podría estar restringida (Conaldi, 1998).

### **1.4.2 Principales manifestaciones de enfermedad renal en pacientes con VIH.**

Las PVVIH tienen mayor riesgo de padecer patología renal manifestándose de distintas formas: insuficiencia renal aguda (IRA), enfermedad renal asociada al VIH (NAVIH), enfermedad renal crónica (ERC), y toxicidad renal relacionada con el tratamiento. La ERC y la enfermedad renal en etapa terminal (ESRD) son bastante prevalentes (Meir-Shafir, 2012).

- **Daño renal agudo (IRA)**. Es más frecuente en PVVIH y se asocia a mayor riesgo de eventos adversos como insuficiencia cardíaca, ECV, ESRD e incluso muerte (Choi, 2010). Suele ser de moderada intensidad, en pocas ocasiones hay necesidad de diálisis y el pronóstico generalmente es bueno. Su incidencia ha disminuido desde la introducción del TAR pero en los últimos años ha aumentado en estadios más graves (Li, 2012; Nadkarni, 2015).
- **Enfermedad renal crónica (ERC)**. Todos sus estadios se han relacionado de forma independiente con mayor riesgo de mortalidad, desarrollo de ECV y mayor número de ingresos hospitalarios. En la cohorte EuroSIDA formada por 4.474 PVVIH, mayoritariamente caucásicos, la prevalencia de ERC fue del 3,5% empleando la fórmula de Cockcroft-Gault y del 4,7% usando la ecuación de modificación de la dieta en la enfermedad renal (MDRD) (Mocroft, 2007). En estudios con mayor proporción de pacientes de raza negra, la prevalencia de insuficiencia renal fue del 15,5% (Wyatt, 2007). En España, la prevalencia fue del 8% en pacientes en TAR y del 4,7% en pacientes sin tratamiento (Sorli, 2008).

El pronóstico de la ERC en PVVIH es peor que en la población no infectada y al aumentar la esperanza de vida se incrementa su incidencia. El 0,3% de una cohorte americana (n=202.927) de pacientes con ERC, eran VIH y se observó que los pacientes de raza negra tenían mayor riesgo de sufrir insuficiencia renal terminal y también de mortalidad (OR: 2,32; IC95%: 1,70–3,18); los de raza blanca mayor riesgo de mortalidad (OR: 2,21; IC95%: 1,57–3,13) que los pacientes no infectados; además, la mortalidad era superior a la de los pacientes diabéticos (Choi, 2007). La prevalencia de infección por VIH descrita en centros de diálisis en España, Francia y Estados Unidos es del 0,59, 0,67 y 1,5%, respectivamente (Vigneau, 2005; Trullas, 2008; Finelli, 2005).

- **Nefropatía asociada al VIH (NAVH)**. Es la nefropatía por excelencia de la infección por VIH, causada por la infección directa y la expresión génica viral en el tejido renal. Suele presentarse en fase avanzada, cuando se suspende el TAR, hay viremias elevadas y recuentos bajos de linfocitos CD4. Puede manifestarse como IRA o como ERC. Si hay TAR es poco frecuente y a pesar de ser la más característica, no es predominante en España (Casanova, 1995; Gutierrez, 2007).

Se asocia con la progresión rápida a ESRD y es casi exclusiva de personas de ascendencia africana, en individuos de raza blanca es poco frecuente (Klotman, 1999; Monahan, 2001).

### 1.4.3 Toxicidad renal relacionada con el TAR.

Además del papel que juega la infección por VIH, varios estudios han puesto de manifiesto la asociación entre fármacos que componen el TAR con el mayor riesgo de progresión de la ERC. Los antirretrovirales más relacionados con el riñón son IP (en particular, indinavir y atazanavir) y TDF (Sandeep, 2014).

El riesgo de toxicidad renal puede aumentar con las interacciones farmacológicas por ejemplo el uso de potenciadores como cobicistat y ritonavir pueden aumentar las concentraciones plasmáticas de tenofovir (EMA, 2018). (Ver tabla 1.2).

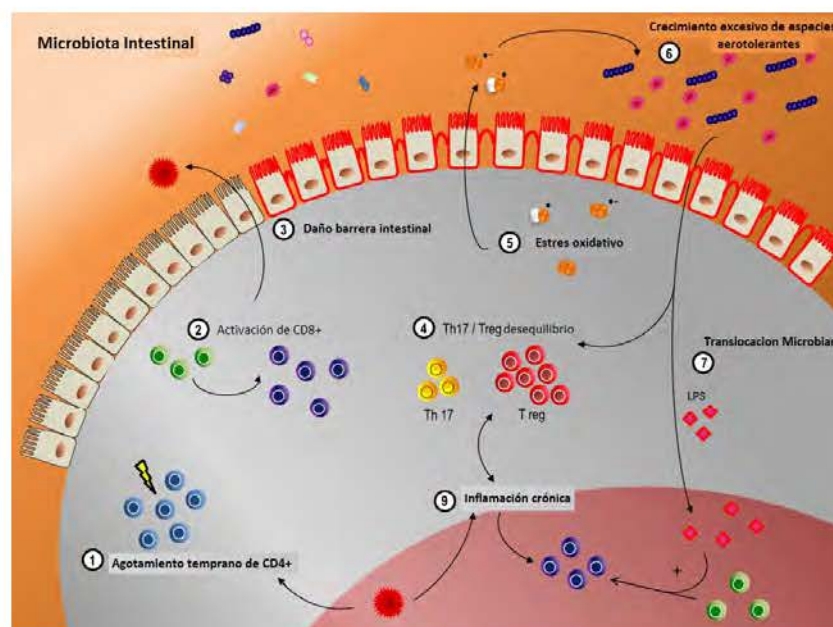
**Tabla 1.2 Esquema de potencial nefrotoxicidad de fármacos antirretrovirales comercializados.**

Fármaco	Nombre comercial	Enfermedades renales asociadas
<b>TDF</b>	Viread (TDF)	Tubulopatía proximal
	Truvada (TDF, emtricitabina)	Proteinuria de bajo peso molecular
	Atripla (rilpivirina, TDF, emtricitabina)	IRA
	Complera (efavirenz, TDF, emtricitabina)	Diabetes nefrogénica
	Stribild (elvitegravir/cobicistat, TDF, emtricitabina)	ERC
<b>TAF</b>	Descovy (TAF, emtricitabina)	No reportados
	Odefsey (rilpivirina, TAF, emtricitabina)	
	Genvoya (elvitegravir/cobicistat, TAF, emtricitabina)	
<b>Atazanavir</b>	Reyataz (atazanavir)	Cristaluria
	Evotaz (atazanavir/cobicistat)	Urolitiasis
		Nefritis Túbulo intersticial ERC
<b>Lopinavir</b>	Kaletra (lopinavir/ritonavir)	Albuminuria
		Proteinuria de bajo peso molecular
		ERC

*Herlitz, 2010; Scherzer, 2012; Brewster, 2004; Izzedine, 2007; Schmid, 2007; Anderson, 2007; Ryom, 2013*

### 1.5 VIH Y Microbiota intestinal

La microbiota intestinal juega un papel clave en diferentes funciones fisiológicas, metabólicas e inmunológicas. Una microbiota sana es esencial para el desarrollo de la inmunidad de la mucosa y modificaciones en ella pueden afectar tanto a enfermedades infecciosas como no infecciosas. La infección por VIH altera la barrera intestinal y genera inflamación crónica que conlleva a un envejecimiento prematuro. En promedio una PVVIH desarrolla enfermedades propias del envejecimiento aproximadamente 10 años antes que la población general (Brenchley, 2004 y 2008; Kotler, 2005; Dillon 2016). La figura 1.4 esquematiza las interacciones entre la infección por VIH, la microbiota intestinal y el sistema inmune adaptativo:



**Figura 1.4 Interacciones entre VIH, microbiota intestinal y sistema inmune. Dubourg, 2016.**

A pesar de sus limitaciones, estudios de cohortes han mostrado diferencias en el microbioma intestinal de PVVIH. Las evidencias obtenidas son muy heterogéneas en cuanto al tipo de pacientes estudiados (tratados versus no tratados), tipos de muestreo utilizados (esponja rectal, hisopo de heces, heces, biopsia tisular) y el nivel de clasificación bacteriana examinado. La disbiosis afecta a la actividad inmunológica originando difusión de bacterias e inflamación (Liu, 2017; Brenchley 2016). La translocación microbiana es un mecanismo de activación inmune (Marchetti, 2008; Estes, 2010; Brenchley, 2006).



La infección por VIH se asocia a un estado inflamatorio crónico representado por un aumento de marcadores inflamatorios (TNFR1; IL-6) (Neuhaus, 2010) y marcadores de activación de las células T (expresión de CD38; HLA-DR) (Deeks, 2004). Se asocia también con marcadores elevados de translocación microbiana, activación monocitaria (LPS y CD14 soluble) y de daño de la barrera epitelial. Durante la infección aguda la activación inmune y la alteración de la barrera intestinal son más pronunciadas pero van disminuyendo con la infección crónica y aún más, con el tratamiento antirretroviral (Tincati, 2016).

Utilizar probióticos puede mejorar la función de la barrera intestinal, disminuir la translocación bacteriana y producción de citoquinas proinflamatorias, lo que mejora la función inmunitaria incluso durante el TAR (Carter, 2016; Klatt, 2013; Gori, 2011).

En el tracto intestinal se produce la mayor replicación y sus complicaciones son quejas frecuentes de PVVIH (Neild, 2000). El VIH tiene un efecto negativo en la relación de la microbiota y el sistema inmunitario, con un declive inmunológico progresivo asociado a una reparación epitelial ineficiente y a una mayor permeabilidad epitelial responsables de trastornos gastrointestinales (Tincati, 2016). Causa ruptura de la barrera intestinal, altera el balance homeostático entre las bacterias del tracto intestinal y la inmunidad del intestino, e induce cambios en la composición de la microbiota (Mutlu, 2014) con el enriquecimiento de poblaciones bacterianas proinflamatorias y potencialmente patogénicas como la *pseudomonas aeruginosa* y *candida albicans* y la reducción de niveles de *bifidus* y *lactobacillus* (Lozupone, 2013).

La mayoría de los estudios PVVIH han mostrado una abundancia significativamente mayor de *Prevotella* y/o significativamente menor de *Bacteroides* que los controles no infectados (Dillon, 2014; Mutlu, 2014; Gebert, 2013; Sun, 2016). Parece haber un enriquecimiento del filo *Proteobacteria* y una disminución del *Firmicute* en muestras de mucosa (Mutlu, 2014; Vujkovic-Cvijin, 2013; Yang, 2016; Dillon, 2016). Los suprimidos con TAR tienden a tener un microbioma más cercano a los controles no infectados comparado a PVVIH no tratados sin embargo el TAR no se asoció con la completa normalización del microbioma (Lozupone, 2013; McHardy, 2013).

## 1.6 Trimetilamina (TMA) y el N-óxido de Trimetilamina (TMAO).

### 1.6.1 ¿Qué son la Trimetilamina (TMA) y el N-óxido de Trimetilamina (TMAO)?

TMAO es un compuesto orgánico que pertenece a la clase de los óxidos de amina, es un sólido incoloro con fórmula  $(\text{CH}_3)_3\text{NO}$  con masa molecular de 75.1 Daltons (ver figura 1.5). Es un compuesto químico que posee dos hidrófilos y propiedades lipofílicas, consta de un grupo hidrófilo  $\text{N}^+\text{O}^-$  y un grupo de tres metilo hidrófobos voluminosos. La parte hidrófila es altamente polar. Por lo general se encuentra en forma de dihidrato. Químicamente se obtiene a partir de trimetilamina (TMA), bajo alta presión o con peróxido la amina reacciona con el oxígeno molecular obteniendo el correspondiente N-óxido (Ufnal, 2015).



Figura. 1.5 Estructura molecular de TMAO. Ufnal, 2015

La trimetilamina es un compuesto orgánico, una amina terciaria con fórmula molecular  $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ , inflamable e higroscópico. A bajas concentración presenta un fuerte olor a "pescado". Es un gas a temperatura ambiente (25 °C). El TMAO se presenta en forma sólida y es menos volátil (Ufnal M, 2015).

El TMAO comúnmente se encuentra en animales, pero también está presente en plantas y hongos. Frecuentemente está en tejidos de varios organismos marinos (Yancey 2001 y 2005): En personas, la mayoría de la formación de TMAO deriva principalmente de la colina y la carnitina ingeridas en la dieta mediante la acción de la microbiota intestinal, que los metaboliza a TMA. El TMA es un compuesto orgánico generado por la microbiota intestinal y el TMAO un producto de oxidación hepática procedente de la TMA (Koeth 2013).

### 1.6.2 Principales precursores de TMA y TMAO.

La generación de TMAO comienza con la ingestión de nutrientes dietéticos que contienen TMA, como colina, fosfatilcolina (PC) y carnitina, que son abundantes en una dieta occidental. Las TMA liasas intestinales utilizan estos nutrientes como sustratos para producir TMA, que a través de la circulación portal en el hígado, se convierte en TMAO por las flavin-monooxigenasas (FMO) (Bennett 2013). A continuación analizaremos sus principales precursores con más detalle.

- **Pescado.** La TMA y el TMAO se encuentran en altas concentraciones en pescados y mariscos. Los peces marinos tienen concentraciones más altas que peces de agua dulce. También hay TMA en aceites de pescado o suplementos dietéticos (Zeisel SH 1983; Bain 2005).
- **Colina y derivados.** La mayoría de alimentos que ingerimos contienen colina o compuestos derivados pero los que tienen mayor contenido son de origen animal, especialmente huevos e hígado. La colina generalmente se ingiere como fosfatidilcolina (Zeisel, 2003). La dieta no es suficiente para satisfacer las necesidades humanas que en promedio contiene unos 500 mg de colina libre mientras que la ingesta adecuada diaria es de 550 mg/día en hombres y 425 mg/día mujeres. El límite máximo va de 1,000 mg/día en niños a 3,500 mg/día en adultos (Inst.Med., Natl. Acad. 1998).

Parece que existe un umbral de concentración de colina que debe ser ingerido para ser convertido a TMAO. Si se ingieren alimentos ricos en colina, la concentración de colina en el intestino delgado excede la capacidad de transporte y alcanza el intestino grueso, donde es metabolizada por bacterias intestinales que producen TMA (Zeisel, 1985; Wang 2011).

- **L-carnitina.** Se obtiene de la dieta y por biosíntesis. Hay altos niveles en carne roja, aves de corral, algunos productos lácteos y en suplementos dietéticos. En contraste con la colina, la L-carnitina es escasa en pescado y huevos. La TMA procede del metabolismo bacteriano de la L-carnitina (y su metabolito  $\gamma$ -butirobetaína). La carnitina en el intestino grueso parece sufrir un procesamiento bacteriano similar a la colina para formar TMA. (Demarquoy 2004; Rigault 2006 y



2008). La carnitina también se puede sintetizar endógenamente en riñón, hígado y cerebro a partir de dos aminoácidos esenciales, lisina y metionina (Flanagan, 2010; Koeth 2013).

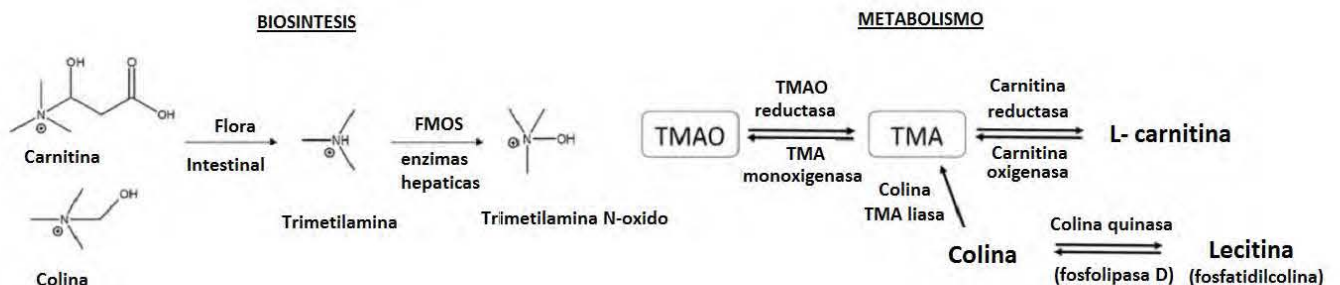
- **Betaína**. Procede de la dieta por la oxidación de colina o carnitina. Los alimentos que contienen betaína principalmente son de origen vegetal, espinacas, remolachas y granos cultivados ambientes altamente osmóticos (Zeisel SH 2003). La ingesta diaria varía entre 30 a 400 mg/dl (Craciun, 2012 y Obeid 2013).
- **Patrones dietéticos**. Se ha demostrado que la concentración de TMAO en sangre aumenta tras la ingestión de colina y L-carnitina en la dieta. Los mariscos son ricos TMAO y TMA (Zeisel, 1983 y Miller, 2014). En un estudio realizado en voluntarios sanos, la ingesta de pescado, carne o huevos no se asoció con los niveles plasmáticos de TMAO, pero si lo hizo la ingesta de lácteos (Rohrmann, 2016). En otra investigación el consumo de pescado se asoció con un aumento de las concentraciones de TMAO en orina (Svensson 1994). Existe poca información relativa a la cinética de TMAO y TMA en sangre humana. Tras consumir una comida con huevos, las concentraciones de TMAO alcanzan su pico a las 6 a 8 horas regresado al estado basal a las 24 horas tras la ingesta (Miller 2014).

### 1.6.3 **Metabolismo para la producción TMA y TMAO.**

#### 1.6.3.1 **Formación de Trimetilamina.**

Aunque la TMA se ha considerado un metabolito normal de la orina en humanos desde el comienzo del siglo pasado, el origen microbiano del metabolito no se estableció hasta 1992 (Al-Waiz, 1998). Se puede obtener bien directamente de alimentos con alto contenido de TMA, como el pescado o bien indirectamente procedente de bacterias del metabolismo de la colina dietética (Seibel, 2002; Zeisel, 1986). Es un compuesto formado en el intestino por la degradación bacteriana de alguno de sus precursores absorbidos del torrente sanguíneo, ya procedan de la dieta, o se reciclen en el intestino (Wang 2014).

Bioquímicamente, el TMA se produce a partir de TMAO por la TMAO reductasa. Se han identificado 2 sistemas de enzimas microbianas que pueden producir TMA a partir de colina o carnitina. La enzima que utiliza colina CutC (polipropéptido catalítico) y el CutD (polipéptido regulador) forma un complejo que usa selectivamente la colina en su forma libre o derivada de la lecitina (PC) mediante la acción de colina-TMA-liasa (Craciun, 2012; Zhu, 2014). De forma similar, la L-carnitina fomenta la formación de TMA directamente a través de un complejo de oxigenasa microbiana (CntA) que se combina con la reductasa microbiana (CntB) para formar un complejo activo que utiliza selectivamente carnitina como sustrato (actividad de carnitina TMA liasa) (Ver figura 1.6) (Fennema,2016).



**Figura 1.6 Metabolismo y vías bioquímicas para producción de TMA y TMAO. Subramaniam, 2017**

La microbiota intestinal juega un papel imprescindible en la conversión de estos nutrientes a TMA. Muchas especies bacterianas están involucradas en la producción de TMA por ejemplo Clostridia, Proteus, Shigella y Aerobacter (Zeisel, 1983).

La mayor parte de la producción de TMA se produce en el ciego y colon. Existen estudios que han evidenciado que ratones gnotobióticos no producen TMA y que el tratamiento con antibióticos de ratones estándar disminuye su formación. La colonización de ratones gnotobióticos con bacterias transformadoras de colina no solo aumenta la producción de TMA en el ciego sino que también disminuye concentración sérica de colina. Esto sugiere que la potencial producción de TMA debería tenerse en consideración cuando se hacen recomendaciones dietéticas de ingesta de colina para humanos (Al-Waiz, 1992; Romano, 2015).

Existen al menos tres mecanismos (no exclusivos) mediante los cuales se puede eliminar el TMA del entorno del colon: absorción en la circulación sistémica,

excreción en heces o a través del metabolismo. Una vez absorbida en la circulación sistémica, la TMA puede excretarse a través de la respiración, el sudor y la orina. Como curiosidad, el síndrome del olor de pescado, trimetilaminuria, caracterizado por un fuerte olor a pescado en las excreciones corporales (orina, sudor, respiración) se debe a una mutación de la isoenzima flavina monooxigenasa (FMO3) por la se excreta la TMA sin oxidar (Treacy, 1998). En personas sanas el TMA se convierte eficientemente en TMAO por la acción de la FMO3 hepática y posteriormente es excreta en orina una proporción TMAO: TMA de 95:3 (Zhang, 1995).

### 1.6.3.2 Formación de Trimetilamina N-Oxido.

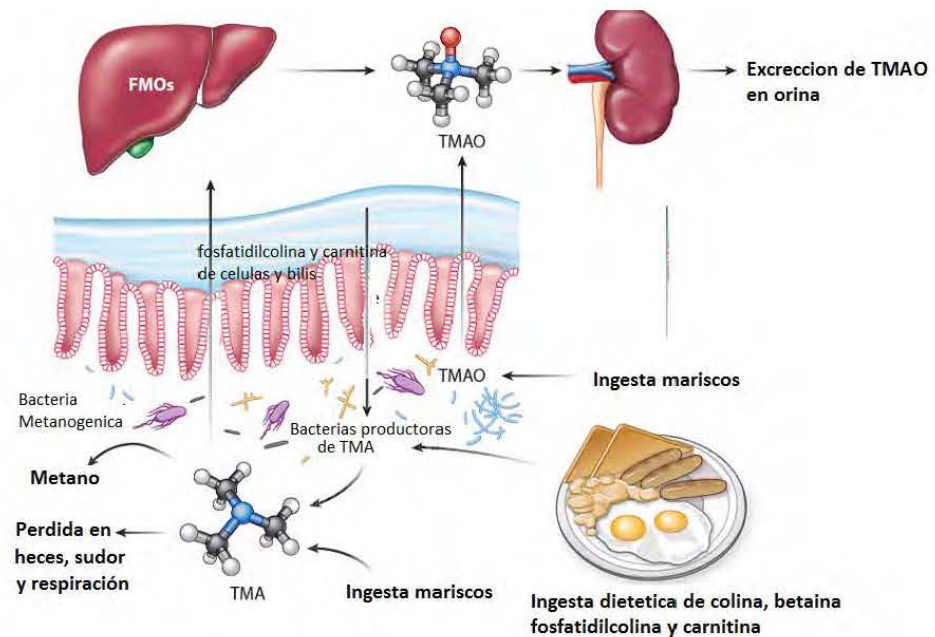
El origen de TMAO puede ser exógeno y endógeno. Ciertos animales marinos lo pueden sintetizar endógenamente sin embargo en los mamíferos terrestres procede de fuentes exógenas (Yancey, 2001; Koeth, 2013; Goldstein, 1972).

La mayoría de la TMA viaja en el torrente sanguíneo al hígado, donde rápidamente se oxida a TMAO por acción de las enzimas hepáticas flavin-monooxigenasas, principalmente la FMO3. Se obtiene a través de dos reacciones microbianas secuenciales: la L-carnitina se convierte inicialmente en un metabolito intermedio –butyrobetaina, luego en TMA, y finalmente en TMAO por la acción de las FMO1 y FMO3 (Marzo, 1997; Anthoni, 1991). Entonces, el TMAO es transportado a los tejidos donde se acumula como un osmolito o, lo que sucede más comúnmente, es eliminado por el riñón (Koeth, 2013; Tang, 2013 y 2015; Lerardi, 2015).

La FMO3 tiene una actividad específica diez veces mayor en el hígado que la que tiene la FMO1 (Bennett, 2013). FMO3 cataliza la oxigenación de TMA. Existen otros sustratos del FMO3 como la cimetidina, clorpromazina, ketoconazol, morfina, propranolol, ranitidina, sulindac, tamoxifeno y tiramina (Koeth, 2013). El tratamiento con antibióticos de amplio espectro reduce las concentraciones de TMAO, lo que refuerza la hipótesis de que las bacterias intestinales son la principal fuente de TMAO sin olvidar que la dieta también es una fuente significativa (Koeth, 2013; Wang, 2011; Tang, 2013).

El 50% del TMAO no se metaboliza y es eliminado casi sin cambios a las 24 horas en orina, es una molécula pequeña que se filtra fácilmente en los riñones (ver

figura 1.7). En un estudio tras la administración de TMA o TMAO radiomarcado, el 94,5% de la dosis fue excretada en la orina en 24 h; solo el 4% de la dosis se excretó en las heces y <1% en el aliento (Al-Waiz, 1987). El TMAO restante se transforma a TMA por la TMA reductasa como hemos comentado anteriormente (Fennema, 2016).



**Figura 1.7 Vías de formación y eliminación de N-óxido de trimetilamina. Tomlinson, 2017**

En pacientes con enfermedad renal las concentraciones circulantes de TMAO aumentaron a medida que disminuyó la función renal y los altos niveles de TMAO se estabilizaron tras el trasplante de riñón. Sin embargo, el grado de aumento en las concentraciones de TMAO no concordaba con la reducción del filtrado glomerular (Stubbs, 2016; Tang, 2016).

### 1.6.4 Papel de la microbiota en la generación de TMAO

La microbiota intestinal juega un papel clave en la formación de TMAO y TMA. En estudios en ratones gnotobióticos el TMAO se acumulaba en suero de los ratones colonizados con bacterias productoras de TMA, pero no en los colonizados con bacterias no productoras de TMA (Romano, 2015). También están los resultados de estudios en controles sanos que recibieron PC y donde se suprimieron los niveles de TMAO administrando oralmente antibióticos de amplio espectro (Tang, 2013).



Hay varias familias de bacterias involucradas en la producción de TMA/TMAO: Deferribacteraceae, Anaeroplasmataceae, Prevotellaceae y Enterobacteriaceae (Koeth, 2013; Zhu 2014). Investigaciones que utilizan aislados de bacterias comensales en el intestino humano han identificado nueve cepas capaces de producir TMA a partir de colina in vitro: ocho especies que representan dos tipos diferentes de filo (Firmicutes y Proteobacteria) y seis géneros que mostraron un consumo significativo de colina y de producción de TMA que incluyen: *Anaerococcus hydrogenalis*, *Clostridium asparagiforme*, *C. hathewayi*, *C. sporogenes*, *Escherichia fergusonii*, *Proteus penneri*, *Providencia rettgeri* y *Edwardsiella tarda* (Romano,2015). Recientemente, los experimentos con bacteria reductora de sulfato degradante de colina, *Desulfovibrio desulfuricans* identificaron un grupo de genes (incluido *cutD*) implicado en la escisión del radical C-N de la colina que conduce a la generación de TMA (Craciun, 2012).

### 1.6.5 Niveles de TMA y TMAO.

Al revisar la información publicada nos encontramos con que los niveles de TMAO circulante muestran grandes variaciones inter e intraindividuales, los rangos son muy amplios lo que puede deberse a distintas razones: cantidad de colina, carnitina, TMA y TMAO en dieta, acción de la microbiota intestinal, acción de enzimas FMO hepáticas y función renal (Romano, 2015).

En sangre de animales de aguas profundas, los niveles van desde 100 a 300 mmol/L (Yancey, 2004). Sin embargo los datos de estudios realizados en ratas y ratones muestran concentraciones plasmáticas de TMAO de aproximadamente 0,6 mol/L en ratas y en ratones de <5 mmol/L (Koeth,2013; Wang, 2011). Tras una infusión de 2 semanas de TMAO, los niveles en sangre aumentaron del orden de 100 veces, pasando de 0,6 a 60 mmol/L, sin producir toxicidad (Ufnal, 2014).

En seres humanos hay que destacar la alta variabilidad interpersonal. En voluntarios sanos la concentración sistémica de TMAO está en un rango de 0.5-5  $\mu$ mol/L llegando hasta 40 mol/L en pacientes con insuficiencia renal (Koeth, 2013; Wang, 2011; Tang, 2013; Bain, 2006). Un estudio desarrollado a nivel de genoma en

1973 sujetos para identificar los factores genéticos asociados a los niveles de TMAO y ver el papel que podría jugar el factor hereditario concluyendo que jugaba un papel marginal (Wang, 2014). El mismo grupo midió los niveles de TMAO en 349 voluntarios sanos mediante tándem cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC/MS/MS) siendo la concentración media  $3,45 \mu\text{M}$  (RIC 2,25-5,79). No hubo diferencias por sexo pero si un aumento de los niveles con la edad (Wang, 2014).

Un aspecto interesante es conocer la variación de los niveles de TMAO a lo largo del tiempo. Durante un año se evaluó en un estudio prospectivo las variaciones en los niveles plasmáticos de TMAO y de dos de sus precursores, betaina y colina (en ayuno) por LC-MS en dos muestras de 100 participantes tomadas con un año de diferencia. En contraste con las concentraciones de betaina y colina, las de TMAO a lo largo del tiempo variaban más a nivel individual que entre los distintos participantes del estudio. Los autores no lo atribuyeron a una causa concreta (Kuhn, 2017).

En un estudio alimentario, el consumo de precursores de TMAO en la dieta, como pueden ser huevos, carne roja y pescado aumentaron los niveles de TMAO tanto en sangre como en orina. Las concentraciones circulantes de TMAO se incrementaron en los 15 minutos tras la ingesta de una comida basada en pescado lo que sugiere que el TMAO podría ser directamente ser absorbido (Cho, 2016).

En cuanto diferencias por sexo señalar que la testosterona suprime y el estrógeno induce la expresión de FMO3, en ratones hembra la actividad de FMO3 es 100 veces mayor en ratones machos. En personas las diferencias observadas en cuanto a genero han sido modestas incluso un estudio mostró una menor formación de TMAO en mujeres (Bennett, 2013; Obeid, 2016).

La concentración de TMA en plasma de personas sanas es de aproximadamente  $24 \mu\text{g/l}$  y en orina se calcula que está por debajo de  $393 \mu\text{g/l}$ . En casos de enfermedad renal los niveles podrían aumentar. En pacientes dializados los niveles plasmáticos están aproximadamente en  $82 \mu\text{g/l}$  considerando que la concentración de TMA se reduce durante diálisis. Situándose los niveles de un paciente dializado en 100-200 ppb ( $0.26-0.46 \mu\text{g/l}$ ) (Wzorek, 2010).

### 1.6.6 Determinaciones de TMAO/TMA en sangre.

La baja concentración y la naturaleza altamente reactiva de las aminas hacen que sea necesaria la aplicación de métodos analíticos adecuados durante el muestreo, almacenamiento y preconcentración. En la determinación de la trimetilamina (TMA) las concentraciones en las muestras gaseosas se complica debido a las dificultades asociadas a sus propiedades: alta basicidad y polaridad (Namiesnik, 2000).

El TMA es una molécula volátil y muy soluble en muestras acidas, por lo que realizar una recogida y almacenamiento de muestras adecuado es importantísimo para una correcta determinación, sin embargo el TMAO no es tan volátil. Estudios de estabilidad muestran que el TMAO en plasma es estable tanto durante el almacenamiento a 80 C durante 5 años como con múltiples ciclos de congelación y descongelación (Wang, 2014).

Los métodos utilizados para medir TMA y TMAO en plasma y orina incluyen:

- Espectrometría de masa de cromatografía líquida (Zhao, 2015).
- Protón nuclear espectrometría de resonancia magnética (Lee, 2006).
- Cromatografía de gases (Mills, 1999).
- Ionización electrospray espectrometría de masas en tándem (Johnson, 2008).
- Desorción / ionización láser asistida por matriz tiempo de vuelo espectrometría de masas (Hsu, 2007).

### 1.7 Relación entre el TMAO y la enfermedad

Originariamente el TMAO era considerado un producto de deshecho del metabolismo de la colina pero ahora se sabe que es una molécula biológicamente activa, modula la homeostasis de lípidos y glucosa, lo puede derivar en una exacerbación de enfermedades crónicas. Aunque se desconocen los mecanismos exactos que las promueve, las investigaciones apuntan a que conseguir reducciones de los niveles de TMAO en plasma podría ser un posible enfoque terapéutico para el tratamiento de tales trastornos crónicos (Subramaniam, 2017).

La aterosclerosis mediada por TMAO podría ser una causa de enfermedad cardíaca y renal, pero los mecanismos subyacentes responsables están por definir (ver figura 1.8). Otras líneas de investigación sugieren la posibilidad de que este biomarcador no sea causal sino que refleje una enfermedad renal causada por aterosclerosis, lo que reduciría la excreción de TMAO, elevando por tanto las concentraciones en plasma.

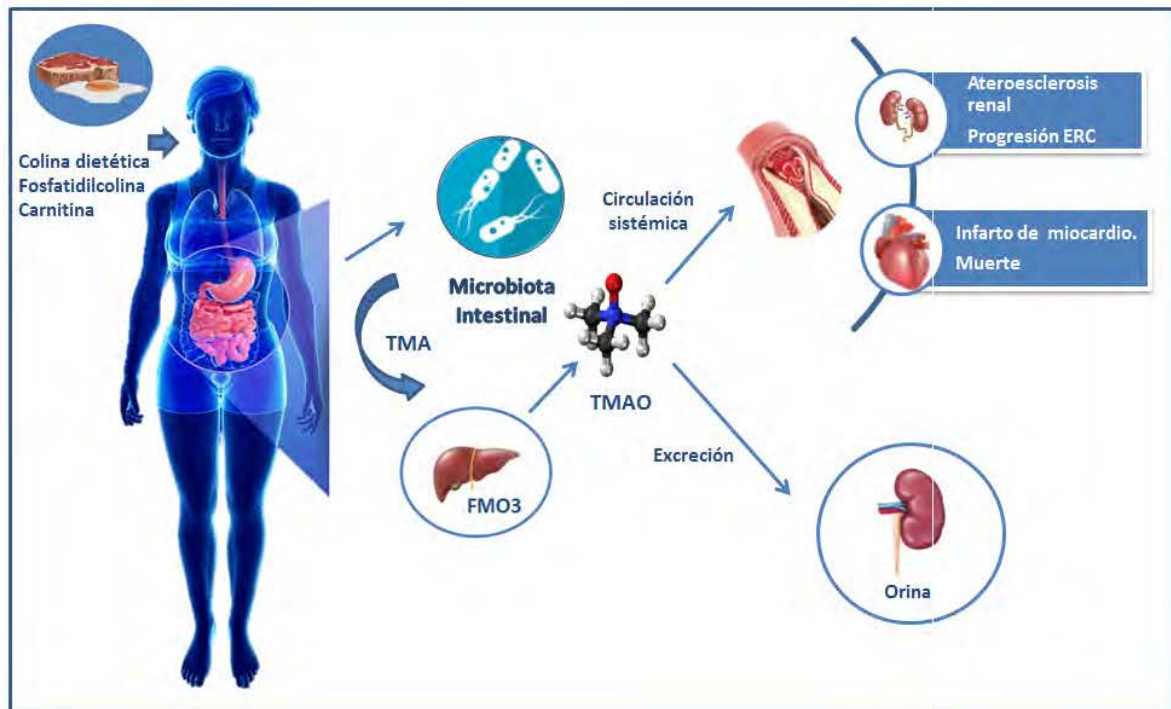


Figura 1.8 Posibles efectos de las concentraciones elevadas de TMAO. Zeisel, 2017

### 1.7.1 TMAO y enfermedad cardiovascular.

La evidencia generada durante los últimos años ha identificado las alteraciones en la composición y metabolismo del microbioma intestinal como factores que contribuyen al desarrollo de ECV. En concreto el TMAO ha tomado mucha relevancia dada su posible acción como promotor de la aterosclerosis por haberse vinculado sus niveles a la enfermedad cardiovascular pudiendo convertirle en un posible marcador de riesgo de ECV (Koeth, 2013; Tang, 2013; Wang, 2014; Troseid, 2015).



### 1.7.1.1 Origen de la asociación TMAO y riesgo cardiovascular.

La asociación entre TMAO y ECV surgió de las hipótesis generadas a partir de análisis metabolómicos de muestras plasmáticas que pretendían identificar nuevos metabolitos que pudieran estar asociados al riesgo cardiovascular. Se analizaron perfiles de metabolitos plasmáticos de pacientes a los que se les realizó una evaluación cardiovascular y que sufrieron un evento a lo largo de los 3 años de seguimiento: IM, accidente cerebrovascular o muerte. Con este enfoque en dos etapas llevado a cabo en 3 cohortes independientes, dos pequeñas y otra de mayor tamaño, consiguieron una lista de 18 metabolitos altamente predictivos de riesgo de CV, procediendo tres de ellos de la degradación de fosfatidilcolina: la colina, la betaína y el TMAO (Wang, 2011).

En una cohorte (n=1,876) que evaluaba niveles plasmáticos de TMAO en ayunas, se confirmó una asociación dosis dependiente con la prevalencia de CVD. Niveles elevados de colina y betaína correlacionaron con mayor riesgo de sufrir eventos cardíacos futuros independientemente de los FRCV. Dicha correlación se producía cuando había un aumento concomitante de niveles de TMAO (Wang, 2014).

La L-carnitina es otro de los metabolitos con potencial pronóstico para el desarrollo de ECV. Niveles plasmáticos elevados de L-carnitina mostraron ser indicativos de CVD en una cohorte 2595 participantes (Koeth, 2013). Al igual que con la colina y betaína, en estudios realizados a mayor escala con seguimiento a 3 años, se observó que el valor pronóstico de eventos cardiovasculares de la L-carnitina también podría estar asociado e ir acompañado de una elevación de niveles plasmáticos de TMAO (Koeth, 2013; Wang, 2013 y 2014). Estos hallazgos se confirmaron en un estudio con seguimiento a cinco años que incluyó pacientes con antecedentes de insuficiencia cardíaca donde se observó que tras ajustar por FRCV e índices cardiorrenales, los niveles de TMAO elevados continuaban siendo predictores de riesgo de mortalidad durante un período de tiempo más prolongado (Tang, 2014).

En esta misma línea van los resultados obtenidos en investigaciones realizadas en ratones propensos a la aterosclerosis alimentados con dietas enriquecidas en colina o TMAO observándose que eran más proclives al desarrollo de aterosclerosis. Es curioso que tanto la producción de TMAO como el aumento de la aterosclerosis

producidos al suplementar dietéticamente con colina dependían de la microbiota intestinal: por un lado el tratamiento con antibióticos prevenía la aterosclerosis inducida por colina y por otro, ratones libres de gérmenes mostraron que los niveles TMAO en sangre solo se detectaban tras ser colocados en jaulas convencionales y tras colonización con microbiota intestinal (Wang 2011).

### 1.7.1.2 Mecanismos de asociación del TMAO y la aterosclerosis.

El mecanismo por el cual TMAO promueve la aterosclerosis continúa siendo una especulación. En primer lugar nos encontramos evidencias sobre la relación de altos niveles plasmáticos de TMAO con factores de riesgo cardiovascular y a su vez con altas concentraciones de sus precursores: colina, betaína y carnitina. Quedaría por definir cómo afectan los factores ambientales y genéticos (poco conocidos).

Por otro lado, estudios experimentales han mostrado que el TMAO afecta a lípidos y a la homeostasis hormonal. Estos mecanismos que afectan al metabolismo del colesterol promueven la formación de células espumosas al aumentar la expresión de receptores scavenger en los macrófagos originando alteraciones en el metabolismo del ácido biliar y en transportadores de esterol en el hígado y el intestino. La vía del ácido biliar juega un papel relevante en la eliminación del colesterol por lo que el bloqueo de esta vía podría promover la aterogénesis (Velasquez, 2016).

El TMAO y sus precursores en la dieta, reprimen el transporte inverso del colesterol a través de mecanismos dependientes de la microbiota intestinal, mecanismos que conducirían a la acumulación de colesterol dentro de las células de la pared arterial. Ratones con microbiota intestinal intacta, suplementados con TMAO dietético mostraron una reducción significativa en la absorción de colesterol, en la expresión hepática de enzimas de ácido biliar, citocromo P450 como en transportadores de ácidos biliares. Sin embargo los niveles de transportadores de colesterol realizados en macrófagos no cambiaron significativamente tras el tratamiento con TMAO (Koeth, 2013). En otros estudios realizados en macrófagos de ratones suplementados con TMAO o con alguno de sus precursores se observó una mayor expresión de dos receptores scavenger implicados en el desarrollo de la aterosclerosis (de CD36 y SR-A) (Wang, 2011).

Estudios en ratones libres de gérmenes y trasplante microbiano, suplementados con colina o TMAO, mostraron que el TMAO aumenta la respuesta plaquetaria y la trombosis in vivo. En personas, los niveles plasmáticos de TMAO predijeron de forma independiente el riesgo de trombosis (ataque cardíaco, accidente cerebrovascular). La exposición directa de plaquetas a TMAO aumentó el estímulo dependiente de la activación plaquetaria de múltiples agonistas mediante liberación aumentada de  $Ca^{2+}$  de las reservas intracelulares. La suma de estos hallazgos proporciona cierta evidencia de un vínculo mecanicista entre la microbiota intestinal, la función plaquetaria y el riesgo de trombosis (Zhu, 2016).

También se ha demostrado que el metabolito bacteriano TMAO afecta a los efectos hemodinámicos de la angiotensina II, hormona clave en la homeostasis del sistema circulatorio. La concentración de TMAO en plasma en ratas fue aproximadamente 10 veces menor que la conocida en humanos. La concentración de TMAO no afectaba a la presión arterial en animales normotensos pero sí prolongaba el efecto hipertensivo de angiotensina II (Ufnal, 2014).

En contraposición existen otras líneas de investigación sugieren que el TMAO puede desempeñar un papel protector en el sistema cardiovascular. En estudios con ratones modificados genéticamente ApoE (-/-) tratados directamente con TMAO o con sus precursores mostraron que el TMAO a concentraciones de hasta 10 veces la concentración máxima conocida en personas no afectó a la formación de células espumosas in vitro. Independientemente del grupo de tratamiento, los niveles de TMAO correlacionaron inversamente con el tamaño de la lesión.

Estos hallazgos sugieren que el TMAO podría ralentizar la formación de lesiones aórticas pudiendo tener un efecto protector y no causal sobre el desarrollo de la aterosclerosis (Collins, 2016). La suplementación oral con l-carnitina mostro un aumento significativo de niveles de TMA y TMAO en plasma lo que podría ser beneficioso ya que se observó una disminución de marcadores de lesión vascular y del estrés oxidativo como las formas solubles de molécula de adhesión intracelular-1 (sICAM-1), la proteína de adhesión celular vascular 1 (sVCAM-1), y el malondialdehído (MDA) (Fukami, 2015).

### 1.7.1.3 **Evidencias de la asociación TMAO y riesgo cardiovascular.**

La relevancia clínica del TMAO se ha expandido recientemente dado que muchos estudios han informado de la existencia de una correlación positiva entre elevados niveles plasmáticos de TMAO y un aumento del riesgo cardiovascular, independientemente de los factores de riesgo tradicionales, como la diabetes o insuficiencia renal (Koeth, 2013; Wang, 2014).

Muchos estudios han vinculado los niveles plasmáticos de TMAO y la colina a pacientes con insuficiencia cardíaca. La translocación bacteriana potenciada, el consecuente aumento de la respuesta inflamatoria y del estrés oxidativo son el resultado de la isquemia y congestión en el intestino inducidas por la insuficiencia cardíaca (Tang, 2014 y 2015b; Troseid , 2015; Troseid , 2016).

Concentraciones elevadas de L-carnitina en sangre en una cohorte de 2,595 pacientes se asociaron a un mayor riesgo de ECV y de eventos adversos cardiovasculares (IAM, accidente cerebrovascular y muerte) (Koeth, 2013). En estudios realizados en Estados Unidos, 80.978 mujeres y 39.434 hombres (cohortes 'Health Study (1980-2012) y Health Professionals Follow-Up Study (1986-2012) respectivamente) una mayor ingesta dietética de fosfatidilcolina, otro precursor del TMAO, se asoció con un mayor riesgo de mortalidad (Zheng, 2016).

En otra cohorte clínica superior a las previas (n=4007) con seguimiento a 3 años, los niveles elevados de TMAO se asociaban a un mayor riesgo de efectos adversos graves de eventos cardiovasculares (IM, accidente cerebrovascular o muerte). El riesgo para el cuartil de TMAO más alto versus el cuartil más bajo en esta cohorte fue de 2.54, siendo significativamente más alto que el de los FRCV como el colesterol LDL. Los niveles TMAO elevados mantuvieron un fuerte valor pronóstico de predicción de eventos adversos cardiovasculares tras ajustar por FRCV, marcadores inflamatorios y función renal estimada (Lewington, 2007; Tang, 2013). Filtrados glomerulares bajos junto a otros factores de riesgo, como son la hipertensión y la diabetes mellitus fueron frecuentes en el cuartil superior de los niveles de TMAO (Tang, 2013; Wang 2014).

En voluntarios sanos se evaluó la ingesta de dos huevos duros y una capsula de fosfatidilcolina marcada con un isótopo estable antes y después de una semana de antibióticos de amplio espectro. Varios metabolitos, incluyendo TMAO, se elevaron tras la estimulación con fosfatidilcolina en los participantes que no recibían tratamiento con antibióticos. Por el contrario, el tratamiento con antibióticos eliminó la producción de TMAO y TMA (Tang, 2013).

Un estudio transversal de 227 pacientes con cirugía cardiovascular para enfermedad arterial coronaria, valvulopatía o enfermedad aórtica, mostró que en el cuartil superior de los niveles de TMAO había un número significativamente mayor de arterias coronarias infartadas en comparación con el cuartil más bajo (OR: 11,9; IC95%: 3,88-36,7;  $p \leq 0,001$ ) (Mafune, 2016).

En otra cohorte canadiense constituida por 292 individuos (99 con ECV y 193 controles), las concentraciones plasmáticas de TMAO se correlacionaron con la ECV significativamente incluso después de considerar variables, como la ingesta de carne, pescado, colesterol sin embargo esta asociación no se produjo con las concentraciones de L-carnitina (Mente, 2015).

En ratones con dieta alta en grasas y azúcar, el TMAO aumenta la alteración de la tolerancia a la glucosa, inhibe la señalización hepática de la insulina y promueve la inflamación del tejido adiposo. En animales y humanos, parece que el TMAO podría ser una molécula mediadora en el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 (Romano, 2015).

Un estudio independiente mostró que los niveles circulantes de TMAO pueden predecir eventos clínicos agudos en pacientes con infarto de miocardio (Lewis, 2008). Especialmente, niveles elevados de TMAO en plasma se han asociado con la disfunción diastólica (Tang, 2015) y una baja supervivencia (Troseid, 2015).

La tabla 1.3 resume los estudios de cohortes prospectivas que han investigado la asociación entre los niveles plasmáticos de TMAO y la enfermedad cardiovascular.



**Tabla 1.3. Principales estudios de cohortes prospectivas que evalúan la asociación de niveles en plasma de TMAO medidos por LCMS con la ECV.**

Autor	Tipo de población	FUP años	n	Edad	Niveles de TMAO	Variables resultado
Tang, 2013.	PG	3	4007	63 ± 11	<2.43 vs >6.18 µM	ECVs o muerte
Lever, 2014	EAC y EAC + DM	5	396	68 (55–93)	<2.8 vs >12.0 µM	ECVs o muerte
Kaysen, 2015	ERC	5	235	61.8 14.2	<27.5 vs >66.6 µM	ECVs o muerte
Tang, 2015	FP	5	112	57 ± 14	<15 vs >15 µM	muerte
Troscid, 2015	FP	0,5	155	57 ± 11	<9.23 vs >9.23 µM	muerte
Kim, 2015	ERC	3	2529	68.2 ± 12.7	<20.41 vs >20.41 µM	ECVs
Ottiger, 2016	NAC & NAC + ECP	6,1	317	72 (57–82)	<2.3 vs >4.1 µM	muerte
Skagen, 2016	EAC	1	264	67.6 ± 8.4	<9.77 vs >9.77 µM	muerte
Missailidis, 2016	ERC	3	179	55 ± 14	<32.2 vs >72.2 µM	muerte
Suzuki, 2016	FP	1	972	78 (69–84)	<5.6 vs >5.6 µM	muerte
Suzuki, 2017	EAC	2	1079	65 (57–77)	<2.9 vs >5.1 µM	ECVs o muerte

*PG: Población general; NAC neumonía adquirida; ECP Enfermedad arteria coronaria ; FC fallo cardiaco; ERC Enfermedad renal crónica; ECV evento cardiovascular; CP Cohorte prospectiva; P plasma; FUP: seguimiento; DM: diabetes mellitus.*

Existe la posibilidad de que este biomarcador no sea causal sino que solo refleje la enfermedad renal originada por la aterosclerosis. Hay estudios que no han demostrado asociación entre TMAO y enfermedad aterosclerótica. En 339 pacientes a los que se les realizó una angiografía coronaria se midieron las concentraciones plasmáticas de TMAO, betaína y colina. Los niveles de TMAO fueron más altos en diabéticos comparados con no diabéticos y en 8 años de seguimiento ni los niveles de TMAO ni betaína se asociaron a IM o a eventos cardiovasculares (Mueller, 2015). En un metanálisis de 13 ensayos controlados (n=3,629) se vio que bajas dosis de L-carnitina oral resultaba en una reducción del 27% en la mortalidad por cualquier causa, en una reducción del 65% en arritmias ventriculares y en una reducción del 40% en los síntomas de angina pacientes que tuvieron un IAM (DiNicolantonio, 2013). En otro estudio realizado en pacientes en hemodiálisis, la suplementación oral de L-carnitina se asoció con un aumento de niveles plasmáticos TMAO pero los marcadores de lesión vascular y los marcadores de estrés oxidativo disminuyeron (Fukami, 2015).

El grupo EPIC estudio más de 400.000 personas y observó una correlación entre la carne procesada y la mortalidad por ECV pero esta asociación no se dio con carne sin procesar (mayor contenido en carnitina y colina) (Rohrmann, 2013). Otro estudio realizado en 3,924 afroamericanos mostro que mayores cantidades de colina dietética se asociaron con un menor riesgo de accidente cerebrovascular isquémico mientras que un mayor consumo de betaína se asoció con un mayor riesgo no de sufrir un incidente coronario (Millard, 2016).

El TMAO podría no contribuir significativamente al avance de la enfermedad aterosclerótica en adultos sanos de mediana edad. Un estudio con 917 pacientes de edades comprendidas entre 33 y 45 años, población relativamente joven en comparación con otros estudios, con 10 años de seguimiento, evaluó el papel que jugaba el TMAO en la progresión de la aterosclerosis. No encontró asociación entre las concentraciones de TMAO y la progresión aterosclerótica medida por GIMc y la presencia o progresión de placas (Meyer, 2016).

En otro estudio de casos y controles de 322 pacientes con accidente cerebrovascular isquémico aterosclerótico de grandes arterias y ataque isquémico transitorio, los participantes con aterosclerosis asintomática no manifestaron ningún cambio ni en microbiota intestinal ni en niveles sanguíneos de TMAO; sin embargo, los pacientes con ataque isquémico transitorio y accidente cerebrovascular mostraron disbiosis significativa de la microbiota intestinal, y sus niveles de TMAO disminuyeron (Yin, 2015). Todas estas evidencias respaldan la necesidad de realizar más investigaciones para definir la relación de causa-efecto entre el TMAO y la ECV.

Es interesante comentar los resultados de un metanálisis realizado en 2017 que analiza los datos de 11 estudios prospectivos de cohortes que concluye que niveles de TMAO más elevados basalmente se asocian de forma independiente con un incremento del 23% de eventos cardiovasculares y un aumento del 55% de la mortalidad por cualquier causa. Bien es cierto que los autores mencionan que la heterogeneidad detectada fue significativa en la correlación entre el TMAO basal y el riesgo de mortalidad por cualquier causa. Estos resultados sugieren que los participantes en los estudios con un TMAO inicial más alto, tenían un mayor riesgo de riesgo cardiovascular futuro (ver figura 1.9) (Jiaqian Qi, 2017).

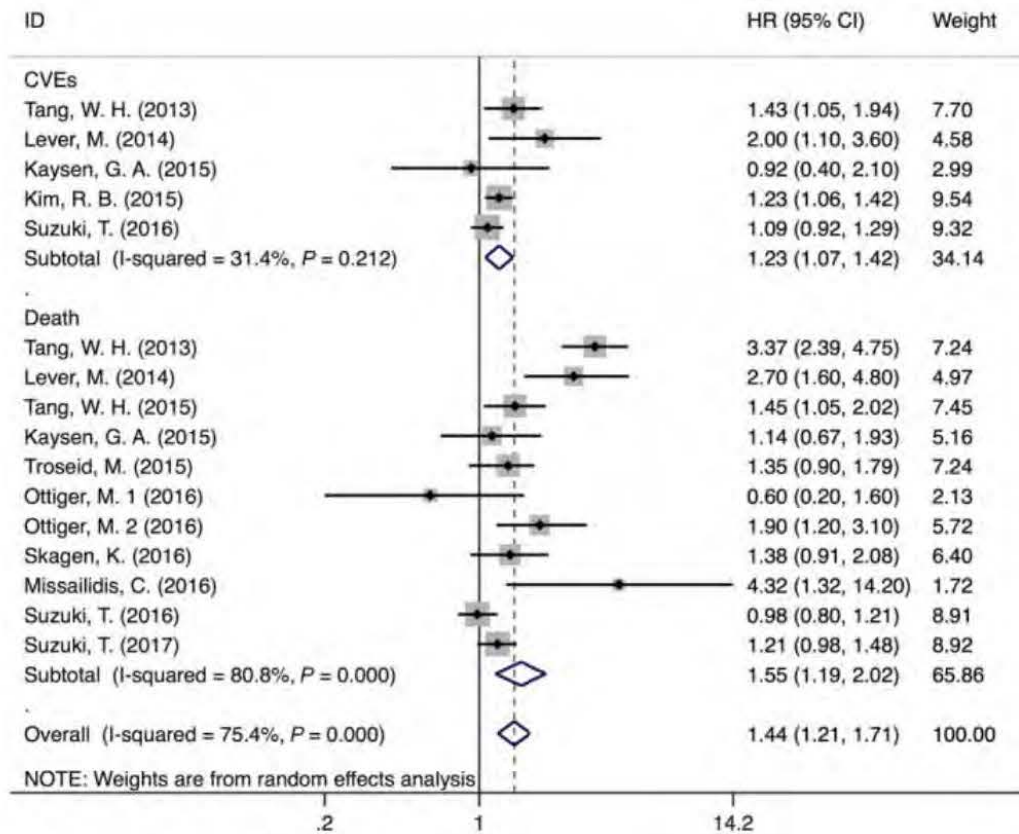


Figura 1.9 Forest plot para la asociación entre TMAO y eventos CV o muerte. Jiaqian Qi, 2017

Teniendo en cuenta toda esta información parece que existe evidencia sustancial que avala la teoría de que los niveles elevados de TMAO están asociados ECV. Sería necesario realizar investigaciones tanto de cohortes prospectivas a gran escala o de estudios de intervención para conseguir evaluar el poder diagnóstico de TMAO y su papel causal en la enfermedad cardiovascular.

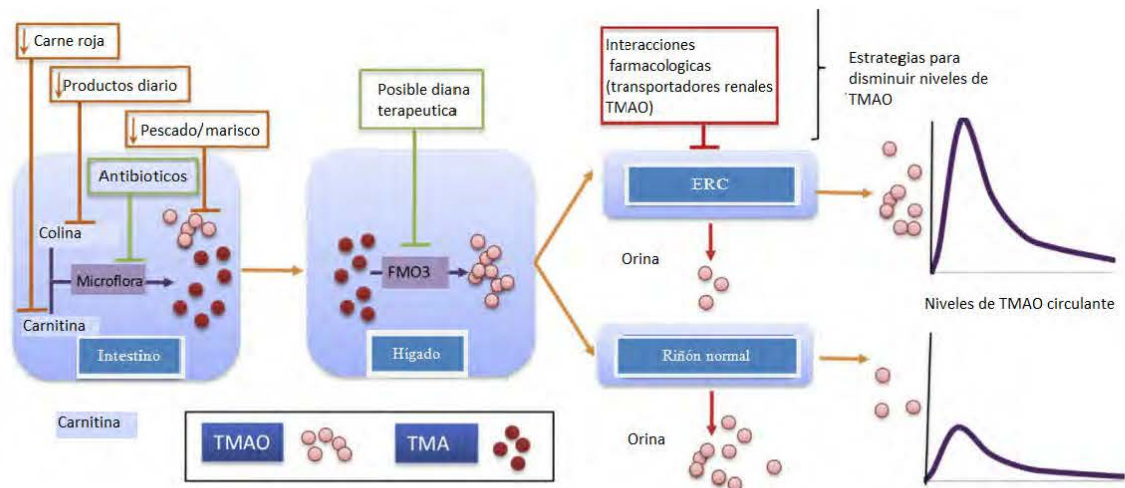
### 1.7.2 TMAO y enfermedad renal.

Los metabolitos de la microbiota intestinal contribuyen a la progresión de la ERC y la ECV a través de un proceso sistémico que comienza con toxicidad urémica seguida de una cascada inflamatoria (Ramezani, 2016; Wing 2016). A su vez las irrupciones en la microbiota intestinal pueden producir endotoxinas que originan una importante respuesta inflamatoria (Nallu, 2017). Estas endotoxinas circulan en el torrente sanguíneo y alcanzan varios órganos donde se produce la disfunción. Los niveles elevados de TMAO pueden ser un factor de riesgo adicional (Chhibber-Goel,



2016) ya que existe evidencia experimental que correlaciona niveles elevados de TMAO con enfermedades crónicas asociadas con la disfunción endotelial y la aterosclerosis (Sun,2016; Schugar 2015; Miao 2015; Koeth 2013; Zhang 1996).

El TMAO se elimina del plasma por vía renal y la excreción urinaria en personas sanas varía casi 700 veces, lo hace pensar que la dieta u otros mecanismos ejercen un efecto relevante (Zhang 1996). Varios son los estudios que han encontrado una mayor acumulación de TMA y TMAO en pacientes con enfermedad renal terminal lo que podría atribuirse al bajo filtrado glomerular y bajo aclaramiento plasmático del TMAO (Bell, 1991; Bain, 2006). Este aumento de los niveles en plasma y orina también podría deberse a la liberación de TMAO de la médula renal como consecuencia del daño renal isquémico (ver figura 1.10) (Hauet, 2000; Doucet, 2014).



**Figura 1.10 Descripción de la producción y niveles de TMAO en relación con la función renal. Kim, 2016**

En la actualidad el tratamiento del riesgo cardiovascular en la ERC se basa en estatinas e inhibidores o bloqueantes de angiotensina (Baigent, 2011; Balamuthusamy, 2008), pero los beneficios que ofrecen en referencia a mortalidad a largo plazo disminuyen al comparar con pacientes sin ERC (Elliott, 2014). La aterosclerosis renal es difícil de separar de la ECV y gran parte de las discusiones sobre la relación entre el TMAO y el riesgo de ECV podrían aplicarse al riesgo de enfermedad renal. Podemos dividir en dos categorías las evidencias que avalan la hipótesis de que el TMAO causa enfermedad renal:

### **1. Modelos experimentales: ratones con TMAO desarrollan enfermedad renal.**

Las exposiciones dietéticas crónicas que aumentan el TMAO directamente contribuyen a la fibrosis renal progresiva y a la disfunción en modelos animales. Ratones C57BL/6J alimentados durante seis semanas con dieta rica en colina o suplementada con TMAO, mostraron mayores concentraciones plasmáticas de TMAO. Estos niveles elevados correlacionaron con un aumento de fibrosis túbulo intersticial y deposición de colágeno, así como aumentos en el marcador -1 de daño renal. Al alimentarlos con este tipo de dieta durante 16 semanas aumentaron también las concentraciones séricas de cistatina C (marcador de lesión renal) (Tang, 2015).

### **2. Altas concentraciones plasmáticas de TMAO en personas con riesgo de padecer enfermedad renal.**

Pacientes con función renal deficiente poseen concentraciones plasmáticas elevadas de TMAO (Rhee 2013; Tang, 2015). En un análisis de 31 pacientes se identificaron 7 metabolitos que diferían en las muestras de pacientes con ERC y sin ERC, siendo las concentraciones plasmáticas de TMAO más altas en los pacientes con ERC (Posada-Ayala, 2014). En 15 pacientes con enfermedad renal terminal comparados con 15 homólogos sanos se observaron concentraciones plasmáticas significativamente más altas de TMA y TMAO (Bain, 2006).

A medida que la función renal va disminuyendo, a partir de estadio 3a (eFG 45-60) ml/ min/1.73 m<sup>2</sup>), las concentraciones TMAO no solo aumentan sino que son muy variables. Se han visto concentraciones medias de 3.3  $\mu$ M (IQR: 3.1-6.0  $\mu$ M) en voluntarios sanos versus 94.4  $\mu$ M (IQR: 54.8-133  $\mu$ M) en personas con enfermedad renal en etapa final. En pacientes con estadios de 3 a 4 de ERC, las concentraciones de TMAO correlacionaban independientemente tanto con la puntuación de enfermedad arterial coronaria severa (evaluada por angiografía cuantitativa) como con la mortalidad pero no fue significativo cuando se probó con los tertiles TMAO (Stubbs, 2016). La mediana de los niveles de TMAO en ERC grado 4 fue mayor que en los pacientes Grado 3b (25,15; IQR 16,64-38,56 frente a 14,32; IQR 9,14-22,69 M) (Kim, 2016).

En 16 pacientes con insuficiencia renal crónica se investigaron los componentes del plasma y la orina por espectroscopia. Las concentraciones plasmáticas de TMAO correlacionaron con el grado de fallo renal. El TMAO se asoció con la concentración plasmática de urea ( $r = 0,55$ ) y creatinina ( $r = 0,74$ ), lo que sugiere que la presencia de TMAO está relacionada con el grado de insuficiencia renal. Cuando ingirieron una comida basada en pescado que contenía TMAO, este apareció rápidamente en plasma y en orina (Bell, 1991).

En 179 pacientes con ERC estadio 3-5, el filtrado glomerular y la función renal alterada fueron las principales variables que afectaban a las concentraciones plasmáticas de TMAO. El aumento de los niveles de TMAO se asoció a marcadores inflamatorios sistémicos y a 5 años predijo una supervivencia reducida (Missailidis, 2016). La concentración sérica de TMAO se asoció inversamente con el filtrado glomerular estimado y fue marcadamente más alta en pacientes en diálisis (Kaysen, 2015; Missailidis, 2016). La hemodiálisis eliminó eficazmente el TMAO de la sangre (Bain, 2006) y aclaró el TMAO a una velocidad similar a la de la creatinina, con reacumulación a concentraciones plasmáticas de aproximadamente 100 mM antes de la sesión de diálisis subsecuente (Hai, 2015; Stubbs, 2016).

Las altas concentraciones plasmáticas de TMAO observadas en la insuficiencia renal tras trasplante renal, disminuyen a valores normales, lo que sugiere que un mejor aclaramiento de TMAO podría ser responsable del menor riesgo cardiovascular observado en receptores de aloinjerto renal (Missailidis, 2016; Stubbs, 2016). Al igual que en personas sin ERC, el aumento de las concentraciones de TMAO se asoció con la predicción de eventos CV y a una mayor mortalidad por enfermedad renal en cohortes con estadios de ERC de moderados a moderadamente graves (etapas 3-4). El TMAO plasmático fue mayor entre los pacientes con ERC grado 3 -5 (eFG <60 ml / min / 1,73 m<sup>2</sup>) que el observado en los pacientes sin ERC (7,9; IQR 5,2-12,4 frente a 3,4; IQR 2,3-5,3  $\mu$ M,  $p < 0,001$ ) (Tang, 2015).

En pacientes estables con enfermedad renal ( $n = 521$ ) se mostró correlación entre las concentraciones plasmáticas de TMAO en ayunas y la mortalidad por cualquier causa. Estos valores elevados de TMAO fueron predictivos del riesgo de mortalidad a cinco años por cualquier causa con un aumento de riesgo de 1,9 veces después de ajustar los factores de riesgo tradicionales, como son la edad, la presión

arterial, el perfil lipídico, la proteína C reactiva de alta sensibilidad, el filtrado glomerular, etc. Incluso entre pacientes que no tenían enfermedad renal grave, las concentraciones elevadas de TMAO indicaron mal pronóstico (Tang, 2015).

En pacientes del Framingham Heart Study (n=1,434) sin ERC al iniciar el estudio se realizaron análisis de metabolitos en plasma mediante cromatografía líquida /espectrometría de masas. A lo largo de los 8 años de seguimiento, 123 individuos desarrollaron ERC, definida por un eFG estimado de <60 ml / min por 1.73 m<sup>2</sup>. El TMAO se asoció con la aparición de ERC incluso tras ajustar por eFG, sexo, diabetes, hipertensión y proteinuria (Rhee, 2013). Otro estudio de metabolómica basado en RMN observó una asociación entre concentraciones urinarias de TMAO y lesiones túbulo intersticiales en pacientes (n = 77) con glomerulonefritis concluyendo que la mayor excreción de TMAO podría deberse a distorsiones túbulo intersticiales (Anderson, 1993).

Finalmente, comentar un estudio de más de 2500 canadienses con ERC y con un período de seguimiento de 3 años, el TMAO plasmático predijo de forma independiente eventos cardiovasculares estadio 3 de ERC, pero no en estadio 4 (donde los niveles de TMAO fueron mucho más variables) (Kim 2013).

Al plantearse si el TMAO es causa o resultado de la disfunción renal hay que ser cautos en la respuesta. Las concentraciones de TMAO son altas en pacientes con enfermedad renal sin embargo, dicha asociación no es suficiente para sustentar la hipótesis de que el TMAO cause enfermedad renal. Al ser el aclaramiento renal un factor determinante de las concentraciones plasmáticas de TMAO, la función renal y el TMAO deberían estar correlacionados a pesar de que el TMAO no cause daño renal.

Algunos estudios no muestran asociación causal entre el TMAO con la morbilidad o la mortalidad originadas por enfermedades renales. Por ejemplo, los estudios en población en hemodiálisis no indican un valor predictivo constante de los niveles plasmáticos de TMAO para el riesgo de enfermedad CV. En una cohorte prospectiva de 235 pacientes con enfermedad renal terminal que requerían hemodiálisis o diálisis peritoneal no se observó relación entre las concentraciones séricas de TMAO y la mortalidad por cualquier causa o los eventos cardiovasculares

pero si correlacionó con la albúmina sérica, la creatinina e inversamente a la proteína C-reactiva (Kaysen, 2015). Parece que el TMAO se elimina de manera más eficiente a través de la urea con una función renal normal que por diálisis (Hai, 2015).

Otro aspecto a considerar es que la corrección estadística para el aclaramiento renal reducido de TMAO usando creatinina o cistatina C basado en medidas de eFG no tiene en cuenta la función tubular, la cual tiene un impacto en la excreción de TMAO. La función tubular puede ser muy variable en cualquier eFG y, a menudo, depende de la ERC subyacente (Suchy-Dicey, 2016).

Además de la confusión relativa a la reducción del aclaramiento renal de TMAO, los factores relacionados con el intestino, propios de la ERC contribuyen a elevar los niveles de TMAO en la sangre. La composición de la microbiota intestinal puede pasar de simbiótica a disbiótica por la influencia de factores "urémicos" como el edema intestinal, tiempo de tránsito reducido, anorexia o seguimiento de una dieta baja en fósforo o potasio (Ramezani, 2014).

Los datos del estudio de Tang et al son la evidencia más convincente de que el TMAO pudiera ser causante de enfermedad renal pero hay que ser cautos a la hora de extrapolar los datos de modelos animales a pacientes (Tang, 2015). Son necesarios más estudios para determinar las causas de tanta variabilidad y para dilucidar si la disminución de TMAO reduce el riesgo CV en pacientes con ERC.

## **2. HIPÓTESIS Y** **OBJETIVOS**



### 2.1 Hipótesis

En base a los resultados obtenidos en población general, la hipótesis de nuestro estudio es que los niveles plasmáticos de los metabolitos bacterianos TMAO y TMA se encuentran relacionados con la presencia de aterosclerosis subclínica y con el deterioro de la función renal en pacientes con infección por VIH.

La principal pregunta de investigación sería si, en pacientes infectados por el virus del VIH, los niveles de TMAO y de TMA se asocian con un mayor grado de enfermedad cardiovascular y/o con una peor función renal.

### 2.2 Objetivos

Para abordar dicha hipótesis nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Investigar la asociación de los niveles plasmáticos de TMAO y TMA con los parámetros inmunológicos y virológicos relativos a la infección por VIH, exposición al tratamiento antirretroviral, y factores de riesgo cardiovascular tradicionales en nuestra cohorte de pacientes.
2. Estudiar en nuestra población de pacientes con VIH la asociación entre los valores plasmáticos de TMAO y TMA con distintos marcadores relacionados con el riesgo cardiovascular: presencia de evento previo, GIM-c y evidencia de placa aterosclerótica.
3. Investigar la relación entre los niveles plasmáticos de TMAO y TMA y diversos biomarcadores de inflamación, coagulación y activación de monocitos (IL-6, usPCR, dímero D, fibrinógeno y sCD14).
4. Evaluar la asociación entre los los valores de TMAO y TMA con distintos parámetros de función renal.





### 3. MATERIAL Y MÉTODOS



### 3.1 Diseño del estudio.

Estudio transversal descriptivo de una serie de casos de pacientes diagnosticados de infección por VIH procedentes de una cohorte clínica del hospital Clínico San Carlos de Madrid.

### 3.2 Población del estudio.

La población de estudio procede de la Unidad de VIH del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Clínico San Carlos del Área 7 de salud de la Comunidad de Madrid. Dicha cohorte clínica de pacientes está formada por pacientes atendidos entre octubre de 2009 y junio de 2011.

Se incluyeron pacientes consecutivos con infección por VIH demostrada, mayores de 18 años que habían recibido tratamiento antirretroviral durante al menos un año. Se excluyeron pacientes naive, pacientes con carga viral detectable (ARN más de 50 copias) y los que no firmaron el consentimiento informado.

El protocolo de este estudio cumple con los principios de la Declaración de Helsinki fue aprobado por el comité ético y el comité de investigación. El código del CEIC de este proyecto es E-09/300.

Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado (ver anexo 8.1). La base de datos se trabajó completamente anonimizada, sin incluir ningún tipo de información que pudiera identificar directa o indirectamente a los participantes del estudio, en concordancia con la legislación española vigente.

En el momento de la inclusión en el estudio, a todos los pacientes se les realizó un examen físico completo y se recopilaron variables sociodemográficas (edad, sexo), antropométricas (peso, altura, cintura,) y clínicas: antecedentes familiares de ECV (definidos como ocurrencia de un evento cardiovascular importante en uno o más familiares de primer grado), historia de tabaquismo, antecedentes de hipertensión arterial (HTA), hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia (definidos siguiendo las

recomendaciones del Tercer Panel de Expertos sobre Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipercolesterolemia en Adultos; NCEP-ATP III, 2002) y de diabetes (criterios según la *American Diabetes Association*). La presencia de síndrome metabólico se definió de acuerdo con los criterios NCEP-ATP III. Una única enfermera determinó en una consulta programada el peso, talla, y el diámetro de la cintura y calculó el IMC.

Además, se recogieron las variables relativas a la infección por VIH: carga viral, recuento de linfocitos CD4 y CD8, nadir de linfocitos CD4, ratio CD4/CD8, tiempo desde el diagnóstico de la infección VIH, historia de coinfección por VHC y VHB. Se registró todo el tratamiento antirretroviral previo y actual, incluyendo el tiempo acumulado de exposición a grupos de fármacos específicos (ITIAN, ITINAN, IP, INI).

#### **3.3 Obtención de muestras.**

A todos los participantes del estudio se les tomó por la mañana en ayunas una muestra de 20 mL de sangre mediante punción venosa, que se repartió en dos tubos. El plasma se obtuvo a partir de la muestra recogida en tubos con EDTA 0,2 M como anticoagulante centrifugando a 1.500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Para la obtención de suero utilizamos el tubo de sangre sin anticoagulante, el cual se centrifugó a 2.500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Tanto el plasma como el suero se alicuotaron y se guardaron congelados a -80°C hasta su uso. Ninguna alícuota sufrió más de dos ciclos de congelación-descongelación.

#### **3.4 Medidas de variables bioquímicas**

Las determinaciones plasmáticas se realizaron mediante métodos estándar en el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Clínico San Carlos.

#### Variables relativas al perfil lipídico:

- Colesterol total, cHDL y triglicéridos fueron determinados por el método CHOD-PAP (inmunoinhibición colorimétrica, Olympus System Reagent AU5400®).
- El cLDL se calculó utilizando la ecuación de Friedewald (Gómez, 2000).

#### Perfil glucémico:

- Glucosa plasmática se determinó por un método glucosa-hexoquinasa, mediante un autoanalizador (Olympus Diagnostics AU2700®).
- Insulina: técnica de quimioluminiscencia (IMMULITE 2000®, Siemens Diagnostics).
- Hemoglobina glicosilada mediante cromatografía de intercambio iónico (HPLC, sistema TOSOHG8®).
- El HOMA (homeostasis model assessment) se calculó mediante la fórmula:  $\text{insulina } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glucosa } (\text{mg/dL}) / 22,5$ .

#### Variables relativas al perfil inmunológico:

- El recuento de linfocitos CD4+ se realizó por citometría de flujo estándar.
- La carga viral de VIH-1 se estableció por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con un límite inferior de 20 copias/mL.
- La infección por VHB y VHC se diagnosticó mediante serología positiva para dichos virus por enzima-inmunoensayo.

#### Biomarcadores séricos:

- PCR ultrasensible (usPCR) se determinó por nefelometría (sistema VISTA®, Siemens Diagnostics).
- Interleukina-6 (IL-6) mediante quimioluminiscencia (IMMULITE 2000®, Siemens Diagnostics).
- Dímero D se determinó por turbidimetría (sistema ACL-TOP®)
- Fibrinógeno a través del método dPT (derivado del tiempo de Protrombina).
- Creatinina se cuantificó mediante la técnica de Jaffé cinético (picrato en medio alcalino, sistema Olympus Diagnostics AU2700®)

- Cistatina C se determinó mediante nefelometría (sistema BN-Prospect®, Siemens Diagnostics).

#### 3.5 **Evaluación del riesgo cardiovascular.**

La evaluación del riesgo cardiovascular se llevó a cabo mediante la puntuación por la escala de Framingham, que evalúa el riesgo de padecer enfermedad coronaria (IAM o muerte) en los siguientes 10 años en función del sexo, la edad, la estatura, el peso, el tabaquismo, la existencia de diabetes, la presión arterial sistólica y el cLDL. El riesgo global es acumulativo y se obtiene a partir de la puntuación total obtenida de la suma individual de puntos asignados a cada factor de riesgo. Los pacientes se clasificaron con bajo riesgo cardiovascular a 10 años cuando la puntuación en la escala fue menor a 10%, riesgo bajo-intermedio cuando la puntuación fue de 10 a 20% y riesgo intermedio-alto cuando fue mayor del 20% (NCEP-ATP III, 2002; Marrugat, 2003; Wilson PW, 1998).

##### 3.5.1 **Medida del grosor íntima-media carotídeo (GIM-c).**

El GIM-c se midió mediante eco-doppler utilizando un sistema de ultrasonido HD7 (Philips) con una sonda sectorial de 12 MHz siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Americana de Ecocardiografía (Rodríguez-Torres, 2008). Mediante ultrasonografía en una imagen longitudinal, cada pared de las arterias carótidas comunes se visualiza como dos líneas paralelas ecogénicas separadas por un espacio hipoecoico. Este patrón de doble línea se corresponde con el cambio de impedancia en la interfase luz-íntima y media-adventicia y es más evidente en la pared posterior.

Tras posicionar al paciente en decúbito supino, con ligera hiperextensión del cuello y rotación de la cabeza hacia la izquierda, el GIM-c se midió en la pared posterior de la arteria carótida común derecha a 1 cm de la bifurcación carotídea, 1 cm proximalmente al bulbo carotídeo y en el origen de la carótida interna (1 cm distalmente a la bifurcación), en regiones libres de placa en las cuales el patrón de doble línea era evidente. La presencia de placas de ateroma se evaluó en toda la



circunferencia de los vasos mediante cortes transversales de la carótida común, el bulbo y la carótida interna del lado derecho. Se definieron como un aumento del GIM focal al menos un 50% superior a la íntima-media de los segmentos adyacentes normales, o como un engrosamiento difuso superior a 1,5 mm. La placa se definió como una estructura focal invadiendo la luz arterial de al menos 0,5 mm o del 50% del valor del GIMc circundante, o también como un engrosamiento difuso de 1,5 mm medido desde la interfase media-adventicia a la interfase íntima-luz.

La resolución axial fue de 0,1 mm para la imagen en tiempo real. Se adquirieron imágenes de segmentos de al menos 10 mm en soporte informático. La cuantificación del GIMc se realizó mediante el software QLab (Advanced Quantification Software), el cual, mediante la evaluación de parejas de píxeles a lo largo de cada línea escaneada en la región de interés seleccionada, proporciona una imagen espacialmente ponderada, que es más difícil de ser alterada por irregularidades aleatorias en la pared del vaso. Este programa ha sido validado exhaustivamente con especímenes histológicos y entre diferentes observadores, incluyendo nuestro grupo de investigación (Secil, 2005; Serrano-Villar, 2012; Serrano-Villar S, 2014).

#### **3.6 Evaluación de la función renal.**

La tasa de filtrado glomerular estimado (eFG, mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) se calculó a través de la fórmula CKD-EPI (*CKD Epidemiology Collaboration*) (Stevens, 2010) y se utilizó para estratificar a los pacientes en: pacientes con función renal normal o elevada (eFG > 90 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>); pacientes con función renal deteriorada (eFG < 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) y pacientes con deterioro de la función renal (eFG < 30 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>), de acuerdo con la Guía de la Fundación Nacional del Riñón de EEUU (Levey, 2009) y recomendaciones del panel de expertos de GESIDA.

#### **3.7 Cuantificación de metabolitos bacterianos.**

##### **3.7.1 Protocolo de análisis de TMAO por LC/MS.**

La detección del TMAO se realizó en muestras de plasma congeladas mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) utilizando como sistema de ionización un electrospray (ESI) y como analizador un cuadrupolo simple (Qp). Existe evidencia de que el análisis por LC-MS es fiable tras realizar múltiples ciclos de congelación-descongelación no afectando a las concentraciones plasmáticas del TMAO (Mente, 2015).

##### **3.7.1.1 Procesamiento de muestras TMAO.**

Una vez descongeladas, las muestras se desproteinizaron utilizando metanol como reactivo precipitante. Para ello, se añadieron 5 µL del estándar interno (D9-TMAO) a una concentración de 10 µg/mL a 50 µL de plasma, y a continuación, 195 µL de metanol. Una vez formado el precipitado, las muestras se agitaron vigorosamente durante 1 minuto aproximadamente, se centrifugaron a 12.500 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente y se separó el sobrenadante, del que se inyectaron 10 µL en el LC-MS. Todas las muestras se evaluaron por duplicado para asegurar la reproducibilidad de resultados.

##### **3.7.1.2 Condiciones cromatográficas y espectrométricas TMAO.**

El análisis de las muestras se llevó a cabo con un sistema LC-MS 2020 (Shimadzu) que utiliza como detector un cuadrupolo simple.

La separación cromatográfica se realizó con una columna de fase reversa C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) de Supelco (Sigma) a 35 °C. La elución se llevó a cabo en gradiente con una solución acuosa de ácido fórmico 1N (fase A) y metanol (fase B): 2 minutos con 80% de fase A, disminución de fase A hasta 35% durante 8 minutos, 1

minuto con 35% de fase A y vuelta a 80% de fase A. La cromatografía se realizó durante 14 minutos a un flujo de 0,2 mL/min.

La detección del TMAO se hizo con un cuadrupolo simple utilizando como fuente de ionización un electrospray (ESI) en modo positivo. Como gas de nebulización (flujo 1,5 L/min) y gas seco (flujo 10 L/min) se utilizó nitrógeno producido por un generador de nitrógeno (Peak Scientific).

Para llevar a cabo la cuantificación se utilizó la relación de alturas entre el TMAO y el estándar interno, monitorizando los iones moleculares (TMAO:  $m/Z=76$  y D9-TMAO:  $m/Z=85$ ) en modo SIM (*Selected Ion Monitoring*). Para evaluar los parámetros de linealidad, exactitud y recuperación se prepararon 6 concentraciones de TMAO (Sigma) por duplicado de 1, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ . La linealidad del método se realizó mediante regresión lineal.

#### **3.7.2 Protocolo de análisis de TMA mediante GC-MS.**

La detección del TMA se realizó en muestras de plasma congeladas mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés) utilizando la microextracción en fase sólida en modo espacio de cabeza (HS-SPME) como técnica de preconcentración del analito de interés para alcanzar altos niveles de sensibilidad.

##### **3.7.2.1 Procesamiento de muestras TMA.**

Una vez descongeladas las muestras a temperatura ambiente, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de cada muestra, 200  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura (Tipo 1) y 150 mg de NaCl y se introdujeron en un vial de 20 mL de vidrio con tapón magnético de rosca y septum de teflón.

En la preconcentración del TMA se empleó fibra de SPME Carboxen/PDMS de 85  $\mu\text{m}$  (Supelco). Para ello, la fibra se introdujo en el espacio de cabeza del vial

durante 45 minutos a 55°C y con agitación a 250 rpm. Una vez transcurrido el tiempo de extracción, se procedió a la desorción térmica de los compuestos retenidos introduciendo la fibra de SPME en el inyector del cromatógrafo de gases a 250°C en modo splitless durante 5 min (Wzorek, 2010).

#### **3.7.2.2 Condiciones cromatográficas y espectrométricas TMA.**

El análisis de las muestras se llevó a cabo con un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas tipo cuadrupolo GCQMS 7890B-5977A (Agilent technologies) provisto de inyector automático de SPME, COMBI PAL (Agilent Technologies).

Para la separación cromatográfica del TMA se utilizó una columna SupelcoWax (30 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$ ) y se trabajó a un caudal constante de helio a 1,0 mL/min. El programa de temperaturas del horno de la columna analítica fue: 80°C durante 4 minutos, se aumentó a 230°C con rampa de temperatura de 15°C/min y se mantuvo a 230°C durante 4 minutos.

La detección del TMA se trabajó con el espectrómetro de masas en modo SCAN en el intervalo 35-100 uma. Para la cuantificación se utilizó el área del pico cromatográfico del ion seleccionado del TMA (58 m/z). La temperatura de la interfase y la fuente de ionización fueron 280°C y 250°C, respectivamente.

Para evaluar los parámetros de linealidad, exactitud y recuperación se prepararon 4 concentraciones de TMA patrón (Clorhidrato de trimetilamina; FLUKA) por duplicado de 10, 50, 100 y 500 ng/mL y se analizó una muestra de suero enriquecida a 100 ng/mL (por triplicado). La linealidad del método se realizó mediante regresión lineal.

#### **3.8 Análisis estadístico**

Las variables cualitativas se presentan con su distribución de frecuencias. Las variables cuantitativas que presentaron una distribución normal se resumen en su media y su desviación estándar (DE) y las variables que no siguieron una distribución normal se expresan con mediana y rango intercuartílico ( $RIC = P_{25} - P_{75}$ ). El estudio de la normalidad se realizó mediante la inspección gráfica del histograma y diagrama de cajas de cada una de las variables continuas.

##### **3.8.1. Relación de TMAO y TMA con las variables estudiadas**

###### **3.8.1.1 Comparabilidad de los grupos en función de los niveles de TMAO y TMA.**

Con el objetivo de evaluar la relación del efecto que tienen los valores de TMAO y TMA sobre las variables cuantitativas y cualitativas se decidió convertir las variables de TMAO y TMA cuantitativas en cualitativa dicotómica en función del valor de la mediana ( $\leq P_{50}$ ) de la muestra. Una vez categorizadas, se compararon las características sociodemográficas y clínicas entre los dos grupos de estudio. Se evaluó la asociación entre variables cualitativas con el test de chi-cuadrado o prueba exacta de Fisher, en el caso de que más de un 25% de los esperados fueran menores de 5. Las comparaciones de las variables cuantitativas que se ajustaron a una distribución normal se realizaron mediante el test de la  $t$  de Student para dos grupos independientes. En el caso de variables que no se ajustaron a una distribución normal, la comparación se realizó mediante el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney.

###### **3.8.1.2 Relación de TMAO y TMA con las variables de resultado cuantitativas.**

###### **Análisis univariado**

Se compararon las medias de las variables de resultado cuantitativas y la variable de exposición principal (niveles de TMAO y TMA en función de la mediana) mediante el test de la  $t$  de Student para dos grupos independientes. Se obtuvieron las diferencias de medias brutas junto a sus intervalos de confianza al 95%.

#### Análisis multivariado

Con el objetivo de estimar el efecto ajustado de los niveles de TMAO y TMA con las variables de resultado cuantitativas, se ajustaron modelos de regresión lineal múltiple. Las variables de ajuste fueron aquellas que en la comparación entre los grupos de estudio presentaron un valor de significación estadística ( $p < 0,10$ ) y/o clínicamente relevantes. Se presentan las diferencias de medias ajustadas entre los dos grupos (niveles de TMAO y TMA en función de la mediana) junto a sus intervalos de confianza al 95%.

#### **3.8.1.3 Relación de TMAO y TMA con las variables de resultado cualitativas.**

##### Análisis univariado

Se evaluó la relación entre las variables de resultado cualitativas dicotómicas y la variable de exposición principal (niveles de TMAO y TMA en función de la mediana) mediante el test de chi-cuadrado. Se presentan las odds ratio (OR) brutas junto a sus intervalos de confianza al 95%.

##### Análisis multivariado

Con el objetivo de estimar el efecto ajustado de los niveles de TMAO y TMA con las variables de resultado cualitativas, se ajustaron modelos de regresión logística múltiple. Las variables de ajuste fueron aquellas que en la comparación entre los grupos de estudio presentaron un valor de significación estadística ( $p < 0,10$ ) y/o clínicamente relevantes. Se presentan los OR ajustados junto a sus intervalos de confianza al 95%.

Para todas las pruebas se aceptó un valor de significación del 5% ( $P < 0,05$ ). El procesamiento y análisis de los datos se realizó mediante el paquete estadístico SPSS v.15.0.

## 4. RESULTADOS





#### 4.1 Análisis descriptivo.

La población de estudio consta de 85 pacientes con infección por VIH. Todos los pacientes estaban recibiendo tratamiento antirretroviral y se encontraban con carga viral indetectable (RNA VIH-1 <50 copias/mL). Los resultados se presentan en la tabla 4.1.

En esta cohorte los pacientes eran relativamente jóvenes ( $47 \pm 10$  años), con alrededor de 11 años diagnosticados con la infección por VIH y 7 años en tratamiento antirretroviral. La mayoría de los pacientes mostraban un buen control inmunológico. En el momento de la inclusión en el estudio la mayoría de los pacientes estaban en tratamiento triple basado en inhibidores de la proteasa o inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa. Únicamente 10 pacientes estaban recibiendo tratamiento con inhibidores de la integrasa (Raltegravir) y sólo 2 pacientes recibían tratamiento con un inhibidor de entrada (Maraviroc). En la tabla 4.1 se muestra el tiempo acumulado de tratamiento.

La frecuencia de tabaquismo era elevada en nuestra población (casi un 38%). Además, más el 74% de los pacientes eran dislipémicos y alrededor del 13 y del 14% de los pacientes eran hipertensos y diabéticos, respectivamente. Las principales características clínicas de los pacientes se muestran en la tabla 4.1.

**Tabla 4.1 Características basales de los pacientes que viven VIH**

Edad, años	47 ± 10
Varones, n (%)	74 (87,1)
Fumador, n (%)	32 (37,6)
Hipertensión, n (%)	11 (12,9)
PAS, mmHg	117 ± 17
PAD, mmHg	72 ± 10
<b>Perfil lipídico</b>	
Dislipemia, n (%)	63 (74,1)
Colesterol Total, mg/dL	188 ± 38
cHDL, mg/dL	50 ± 12
cLDL, mg/dL	110 ± 37
Triglicéridos, mg/dL	121 ( 91-192)
Antecedentes familiares enfermedad cardiovascular, n (%)	5 (5,9)

Tabla 4.1 Características basales de los pacientes VIH

<b>Perfil glucémico</b>	
Diabetes mellitus, n (%)	12 (14,1)
Insulina, $\mu$ U/mL	7,9 (3,3-14,7)
Glucosa, mg/dL	97,6 $\pm$ 17,8
Resistencia a la insulina (HOMA)*, n (%)	22 (25,9)
Hemoglobina A1c, %	5,6 $\pm$ 0,7
IMC, kg/m <sup>2</sup>	23,8 $\pm$ 2,9
Síndrome metabólico, n (%)	9 (10,6)
<b>Parámetros relacionados con el VIH</b>	
Duración de la infección VIH, años	11 (4 - 15)
Tiempo de tratamiento, meses	88 (36 - 140)
Linfocitos CD4, cel/mL	536 (385 - 709)
Nadir CD4, cel/mL	256 (180 - 358)
Linfocitos CD8, cel/mL	761 (547 - 996)
Ratio CD4/CD8	0,76 (0,50-0,99)
Nadir ratio CD4/CD8	0,24 (0,12-0,42)
Tiempo de tratamiento antirretroviral acumulado	
Exposición a IP, meses	76 (28-120)
Exposición a ITIAN, meses	162 (68-255)
Exposición a ITINAN, meses	52(22-83)
Coinfección por VHC, n (%)	24 (28)

*PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; IMC: índice de masa corporal; IP: inhibidores de la Proteasa; ITIAN: Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido; ITINAN: Inhibidores de la transcriptasa inversa No análogos de nucleósido.*

*\* Se define resistencia a la insulina cuando HOMA-R  $\geq$  3,6*

*Los datos se expresan como la media  $\pm$  DE o la mediana (rango intercuartilo).*

Respecto al riesgo cardiovascular, solo 10 pacientes habían sufrido un evento previo a su inclusión en el estudio. Al aplicar el modelo de Framingham, más del 87% de los pacientes presentaban un riesgo bajo (<10% de probabilidad de sufrir un evento coronario en los siguientes 10 años). Su GIMc medio fue de 0,59 cm y solo 4 pacientes presentaban evidencia de placas de ateroma carotídeas en el momento de su inclusión en el estudio. Se diagnosticó la presencia de enfermedad cardiovascular subclínica (ECVs) en los pacientes con GIMc mayor del percentil 75 (0,69 cm) y/o con presencia de placas de ateroma carotídeas. En la tabla 4.2 se detalla el estado de la enfermedad cardiovascular de nuestra cohorte.

**Tabla 4.2 Parámetros basales relacionados con ECV de los pacientes VIH.**

Eventos previos, n (%)	
Angina	1 (1,2)
IAM	7 (8,2)
Otros	2 (2,4)
GIMc, cm	0,59 ± 0,13
Presencia de placa, n (%)	4 (4,7)

**Framingham score, n (%)**

Riesgo bajo (riesgo ECV estimado <10%)	11 (87,1)
--	-----------

*ECV: Enfermedad Cardiovascular; IAM: Infarto agudo de miocardio; GIMc: Grosor Intima-media carotideo; ECVs: Enfermedad Cardiovascular subclínica;*

*Los datos se expresan como la media ± DE o la mediana (rango intercuartilo).*

Los parámetros inflamatorios y de coagulación también fueron analizados y se muestran en la tabla 4.3:

**Tabla 4.3 Parámetros basales de inflamatorios y de coagulación de los pacientes VIH**

us PCR, mg/dL	0,43 (0,06-0,40)
IL-6, ng/mL	3,58 (1,90-2,53)
sCD14, ng/mL	1,97 ± 0,44
D-Dímero, ng/mL	221 (90 -319)
Fibrinógeno, mg/dL	315 (255 -361)

*Los datos se expresan como la media ± DE o la mediana (rango intercuartilo).*

Respecto a la función renal (tabla 4.4), la mayoría de los pacientes (76,5%) mostraron una función renal moderadamente reducida (eFG 60-89 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) y sólo 5 pacientes (5,9%) presentaron una reducción severa de la función renal (eFG <60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>), de acuerdo a las guías de la *US National Kidney Foundation*.

**Tabla 4.4 Parámetros basales de función renal de los pacientes VIH**

eFG (CKD-EPI), mL/min/1,73m <sup>2</sup>	79,7 ± 13,0
Cistatina C, mg/dL	0,80 ± 0,16
Creatinina, mg/dL	1,1 ± 0,15
eFG <90 mL/min/1,73 m <sup>2</sup> , n (%)	70 (82,4%)

eFG: Filtrado glomerular estimado.

*Los datos se expresan como la media ± DE.*

#### 4.2 Metabolitos de la microbiota intestinal en pacientes VIH.

La determinación de los metabolitos de la microbiota intestinal TMAO y TMA en sangre se realizó en 85 y 71 sujetos infectados por VIH, respectivamente. Los niveles de TMAO detectados se encontraron en el rango de 2,75 a 8,71  $\mu\text{M}$  y los de TMA de 4,7 a 8,5  $\mu\text{M}$  (Ver figura 4.1). Como muestra control se analizaron las concentraciones en plasma de TMAO y TMA en 25 sujetos no infectados por VIH (44% hombres con  $43 \pm 12$  años de edad y sin factores de riesgo cardiovascular), encontrándose los niveles en un rango de 2,85 a 9,05  $\mu\text{M}$  para el TMAO y de 2,54 a 4,56  $\mu\text{M}$  respectivamente (Ver figura 4.1).

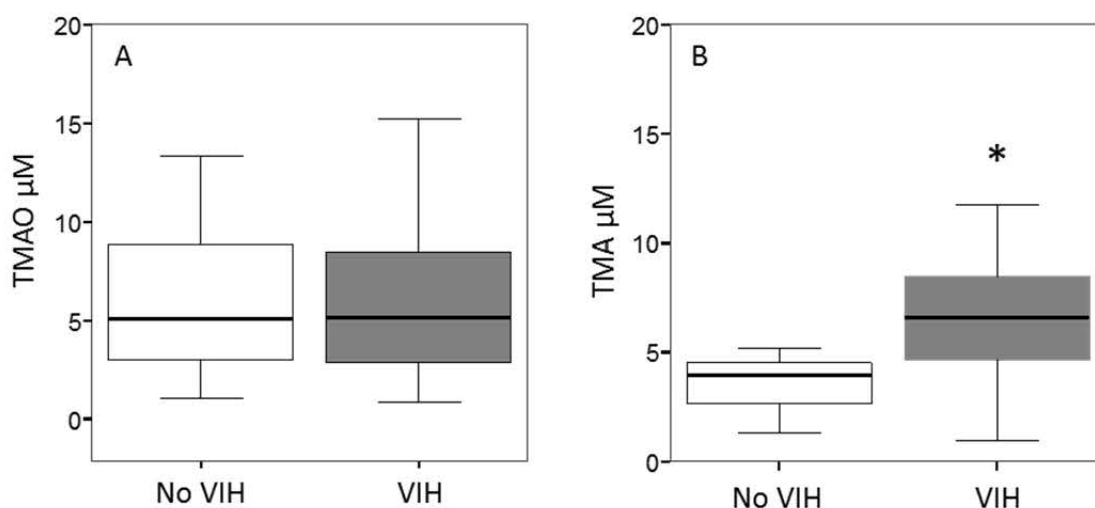


Figura 4.1 Niveles de TMAO y TMA en población VIH y población control no infectada.

#### 4.3 Relación de TMAO y presencia de enfermedad cardiovascular, inflamación y enfermedad renal.

Como se ha comentado, existen estudios que sugieren que en la población general existe un umbral por encima del cual los valores de TMAO serían un predictor de eventos cardiovasculares (Tang, 2013). Para investigar si el TMAO podría ser también un marcador de ECV y/o enfermedad renal en pacientes con VIH, decidimos estratificar nuestra cohorte de pacientes en dos grupos: pacientes con niveles de TMAO por encima o por debajo de 5,16  $\mu\text{mol/L}$ , siendo éste el valor de la mediana en



nuestra población. De este modo, 41 pacientes presentaron niveles de TMAO por debajo de la mediana [2,77 (2,06-3,71)  $\mu\text{mol/L}$ ] y 44 pacientes por encima [12,12 (5,75-12,74)  $\mu\text{mol/L}$ ].

Al comparar las características de los PVVIH en función de sus niveles plasmáticos de TMAO, aunque los pacientes con niveles más altos de TMAO eran mayores que los pacientes con niveles más bajos (tabla 4.5.), no se observaron diferencias significativas ni en la distribución de sexo, ni en las variables bioquímicas relacionadas con los factores de riesgo cardiovascular. Respecto a los parámetros virales, los pacientes con niveles de TMAO más altos tendieron a tener más tiempo de TAR acumulado, principalmente con IPs e ITIANs (tabla 4.5). Las concentraciones plasmáticas de TMAO por encima de la mediana se asociaron a valores más altos de glucemia en ayunas, valores de HbA1C y una mayor proporción de pacientes diagnosticados de diabetes.

<b>Tabla 4.5 Características de pacientes VIH en función de los niveles plasmáticos de TMAO</b>			
	<b>TMAO BAJO</b> (TMAO < 5,16 $\mu\text{M}$ )	<b>TMAO ALTO</b> (TMAO $\geq$ 5,16 $\mu\text{M}$ )	<b>p</b>
<b>Características basales</b>			
Edad, años	44 $\pm$ 10	50 $\pm$ 10	<b>0,013</b>
Varones, n (%)	33 (80,5)	41 (93,2)	0,081
Fumador, n (%)	15 (41,7)	17 (40,5)	0,969
Hipertensión, n (%)	4 (9,8)	7 (15,9)	0,398
PAS, mmHg	113 $\pm$ 15	120 $\pm$ 18	0,650
PAD, mmHg	70 $\pm$ 8	73 $\pm$ 10	0,159
<b>Perfil lipídico basal</b>			
Dislipemia, n (%)	31 (75,6)	32 (72,7)	0,762
Colesterol Total, mg/dL	189 $\pm$ 35	186 $\pm$ 42	0,684
cHDL, mg/dL	51 $\pm$ 14	49 $\pm$ 10	0,673
cLDL, mg/dL	112 $\pm$ 34	108 $\pm$ 40	0,574
Triglicéridos, mg/dL	106 (88-175)	130 (95 -197)	0,157
<b>Perfil glucémico</b>			
Diabetes mellitus, n (%)	3 (7,7)	9 (20,9)	<b>0,090</b>
Insulina, $\mu\text{U/mL}$	10,6 $\pm$ 13,5	14,1 $\pm$ 15,2	0,983
Glucosa, mg/dL	93,4 $\pm$ 12,3	101,5 $\pm$ 21,2	<b>0,021</b>
Resistencia a la insulina (HOMA)*,n (%)	9 (29,0)	13 (35,1)	0,592
Hemoglobina A1c, %	5,37 $\pm$ 0,47	5,86 $\pm$ 0,88	<b>0,010</b>
IMC, $\text{kg/m}^2$	24,2 $\pm$ 2,7	23,1 $\pm$ 3,0	0,401
Síndrome metabólico, n (%)	6 (18,2)	3 (9,1)	0,475

**Tabla 4.5 Parámetros relacionados con el VIH en función de los niveles plasmáticos de TMAO**

	<b>TMAO BAJO</b> (TMAO < 5,16 µM)	<b>TMAO ALTO</b> (TMAO ≥ 5,16 µM)	<b>p</b>
Duración de la infección VIH, años	11 ± 7	11 ± 6	0,544
Tiempo de tratamiento, meses	77 (23 - 135)	99 (47 - 144)	<b>0,063</b>
Linfocitos CD4, cel/mL	556 ± 228	543 ± 219	0,789
Nadir CD4, cel/mL	265 ± 132	276 ± 175	0,801
Linfocitos CD8, cel/mL	742 ± 291	877 ± 389	0,076
Ratio CD4/CD8	0,81 ± 0,35	0,77 ± 0,66	0,801
Nadir ratio CD4/CD8	0,36 ± 0,26	0,24 ± 0,77	<b>0,033</b>
Tiempo de tratamiento antirretroviral acumulado			
Exposición a IP, meses	64 (32 - 116)	60 (26 - 130)	0,083
Exposición a ITIAN, meses	110 (48 - 255)	186 (93 - 254)	<b>0,048</b>
Exposición a ITINAN, meses	36 (22 - 61)	47 (24 - 91)	0,371
Coinfección por VHC, n (%)	13 (34,2)	11 (26,8)	0,476

*PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; IMC: índice de masa corporal; IP: inhibidores de la Proteasa; ITIAN: Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido; ITINAN: Inhibidores de la transcriptasa inversa No análogos de nucleósido.*

\* Se define resistencia a la insulina cuando HOMA-R ≥ 3,6

Los datos se expresan como la media ± DE o la mediana (rango intercuartilo).

#### 4.3.1 Relación de TMAO Y presencia de enfermedad cardiovascular.

En nuestra población, la concentración plasmática de TMAO se correlacionó positivamente con una mayor probabilidad de sufrir un evento coronario en los siguientes 10 años ( $r= 0,227$ ;  $P < 0,05$ ) (ver figura 4.2). Así, los pacientes con un riesgo cardiovascular bajo según el modelo de Framingham (<10%) presentaban niveles de TMAO significativamente menores que los pacientes con riesgo intermedio o alto (ver figuras 4.2 y 4.3).



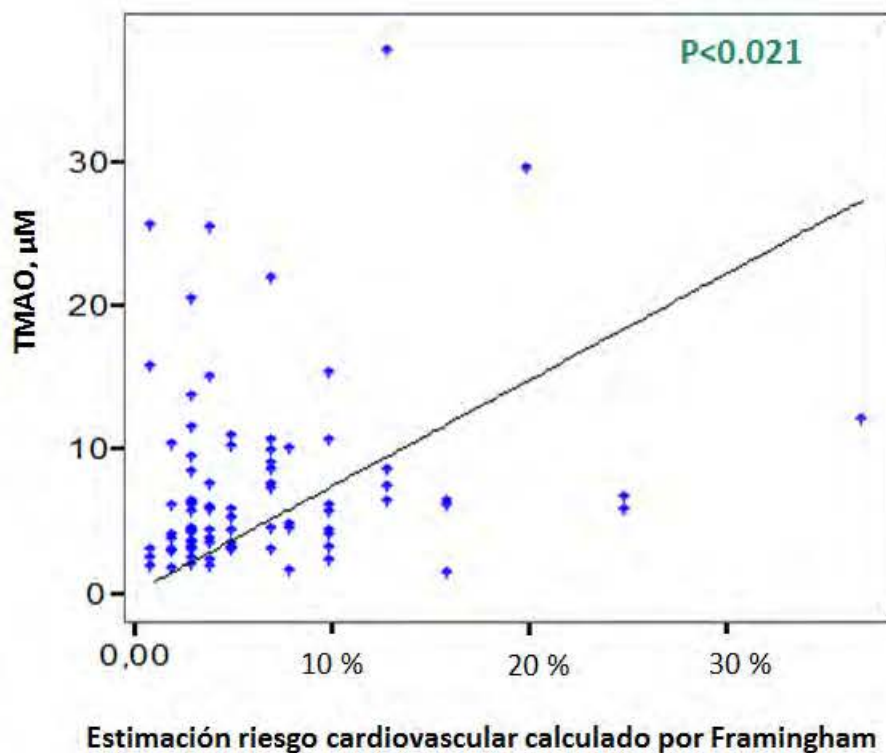


Figura 4.2. Correlación de los niveles de TMAO con el RCV calculado por Framingham en PVIH.

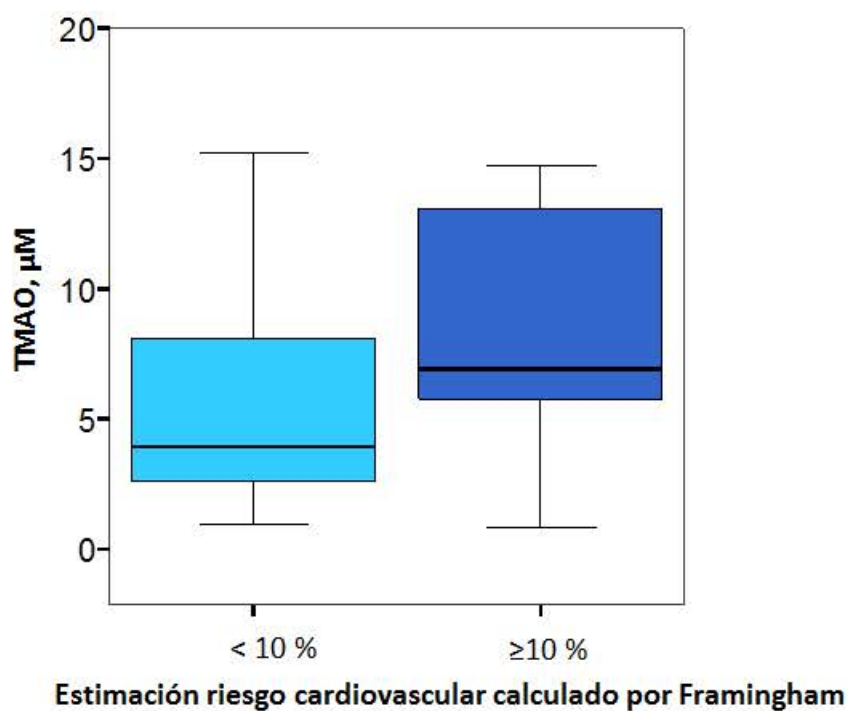


Figura 4.3. Niveles de TMAO en relación al Framingham (FRS) en PVIH.

Cuando estratificamos a los pacientes en función de sus niveles de TMAO (por encima o por debajo de 5,16  $\mu\text{M}$ ) no hubo diferencias significativas entre los grupos respecto al GIMc (tabla 4.6). Sin embargo, la mayoría de los pacientes en los que se identificaron placas de aterosclerosis o que se diagnosticaron de ECVs se distribuyeron en el grupo de pacientes con niveles de TMAO alto (tabla 4.6).

Al analizar los pacientes con eventos cardiovasculares, el número de pacientes con un evento previo fue aproximadamente el doble en el grupo de pacientes con TMAO alto que los del grupo con niveles de TMAO bajos (tabla 4.6). Aunque estos datos no alcanzaron significación estadística probablemente por el pequeño tamaño muestral, los pacientes que habían sufrido algún evento previo tendieron a mostrar concentraciones plasmáticas de TMAO más altas que los que no los habían tenido [5,6 (3,7-9,7) vs 4,6 (2,6-8,9)  $\mu\text{M}$ ,  $P=0,390$ ].

**Tabla 4.6 Distribución de la ECV en pacientes VIH en función de sus niveles de TMAO.**

	<b>TMAO BAJO (TMAO &lt; 5,16 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>TMAO ALTO (TMAO <math>\geq</math> 5,16 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>p</b>
GIMc, cm	0,58 $\pm$ 0,11	0,60 $\pm$ 0,14	0,377
Presencia de Placa, n (%)	1 (2,9)	3 (8,1)	0,615
ECVs, n (%)	8 (22,9)	13 (35,1)	0,252
Eventos previos, n (%)	3 (7,3)	7 (15,9)	0,316
Framingham score bajo, n (%)	40 (97,6)	34 (77,3)	<b>0,005</b>

*Los datos se expresan como la media  $\pm$  DE o la mediana (rango intercuartilo).*

GIMc: Grosor íntima-media carotídeo; ECV subclínica (ECVs): GIMc>p75 y/o presencia de placa.  
Framingham score bajo: <10% de probabilidad de sufrir un evento en los siguientes 10 años.

La proporción de pacientes con riesgo cardiovascular bajo según el modelo de Framingham fue significativamente menor en el grupo con TMAO por encima de 5,16  $\mu\text{M}$  (tabla 4.2).

#### 4.3.2. Relación de los niveles de TMAO con parámetros Inflamatorios.

No se encontró asociación entre los niveles de marcadores sistémicos inflamatorios o de coagulación y los de TMAO. Los niveles altos de TMAO no se asociaron significativamente con mayores concentraciones de usPCR [0,24(0,06-0,50) vs 0,11(0,06-0,22) mg/dL,  $P=0,107$ ], de IL-6 [1,90 (1,90-2,45) vs 1,90 (1,90-2,76) ng/mL,  $P=0,981$ ], de sCD14 [ $2,02\pm 0,46$  vs  $1,91\pm 0,41$  ng/mL,  $P=0,422$ ], de dímero D [179 (80-325) vs 176 (93-317) ng/mL,  $P=0,859$ ] o de fibrinógeno [ $328\pm 77$  vs  $304\pm 69$  mg/dL,  $P=0,211$ ].

#### 4.3.3. Relación de TMAO y la presencia de enfermedad renal.

Los niveles de TMAO se correlacionaron negativamente con el filtrado glomerular (CKD-EPI) ( $r=-0,243$ ,  $P=0,025$ ) y positivamente con los niveles de cistatina C ( $r=0,238$ ,  $P=0,046$ ) (ver figura 4.4 y figura 4.5).

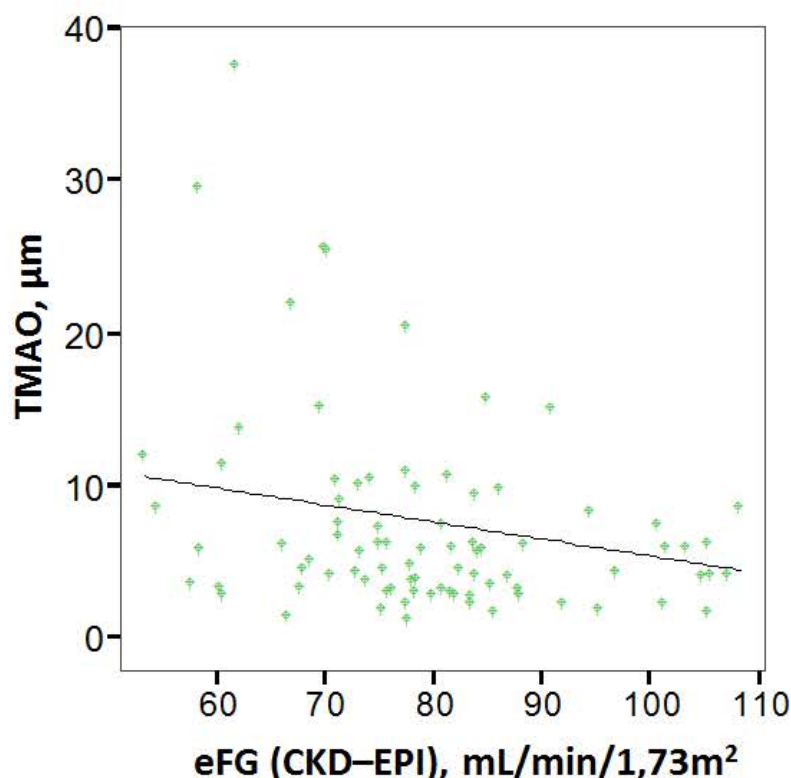
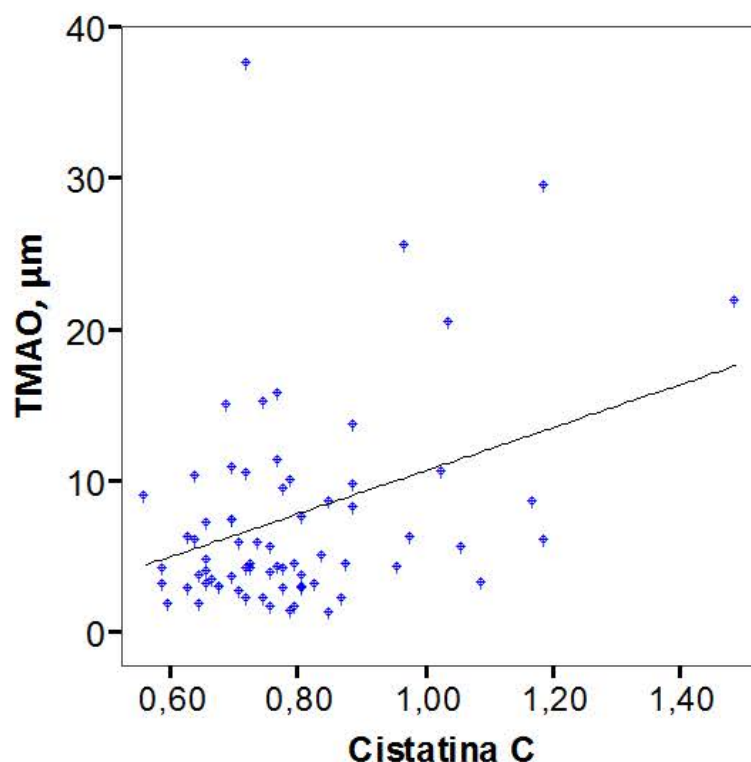


Figura 4.4. Relación de los valores de TMAO con el CKD-EPI en PVIH.



**Figura 4.5. Relación de los valores de TMAO con la cistatina C en PVVIH.**

Los pacientes con insuficiencia renal ( $eFG < 60 \text{ mL/min/1,73m}^2$ ) presentaron mayor tiempo de infección por VIH [15 (13-18) vs 11 (4-15) años], mayor exposición al TAR [117 (73-148) vs 86 (33-139) meses], y menor relación CD4/CD8 [0,62 (0,51-0,74) vs 0,80 (0,49-0,99)] que los pacientes con filtrado glomerular normal ( $>90 \text{ mL/min/1,73m}^2$ ).

Los niveles de TMAO fueron más elevados en pacientes con insuficiencia renal que en los que tenían función renal normal (ver figura 4.6). Los pacientes con insuficiencia renal eran mayores ( $61 \pm 13$  frente a  $47 \pm 9$  años,  $P < 0,005$ ), tenían mayor GIMc ( $0,76 \pm 0,20$  vs  $0,58 \pm 0,11 \text{ mm}$ ,  $P < 0,05$ ) y mostraron niveles plasmáticos de sCD14 más elevados ( $2,7 \pm 0,7$  frente a  $1,9 \pm 0,4 \text{ ng / ml}$ ,  $P < 0,05$ ) (ver figuras 4.7 y 4.8).

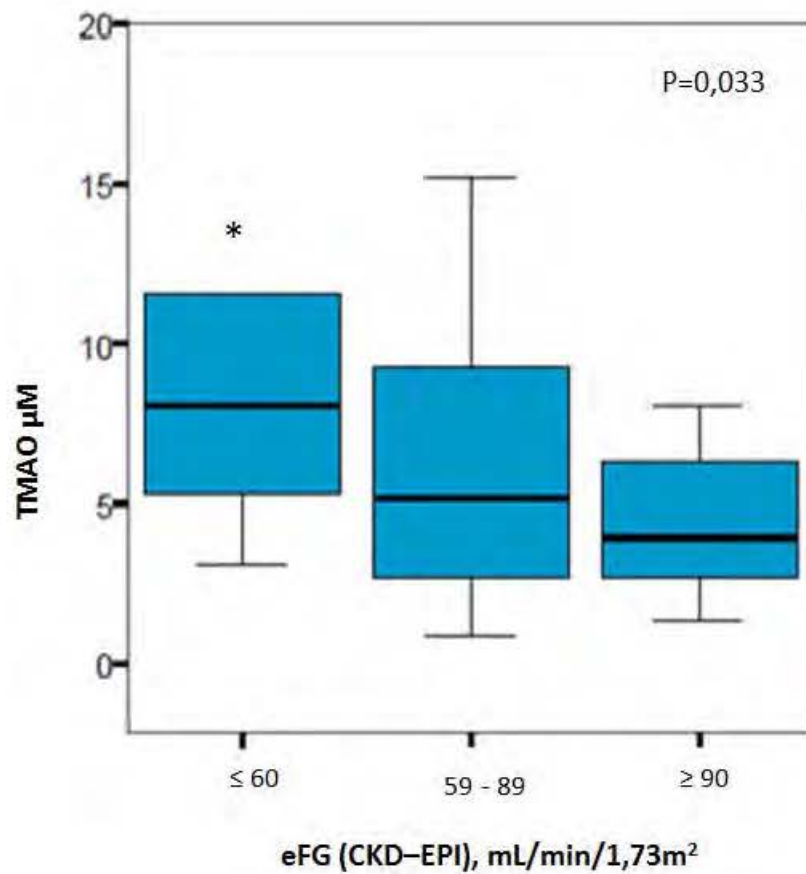


Figura 4.6. Niveles de TMAO en función del CKD-EPI en PVVIH.

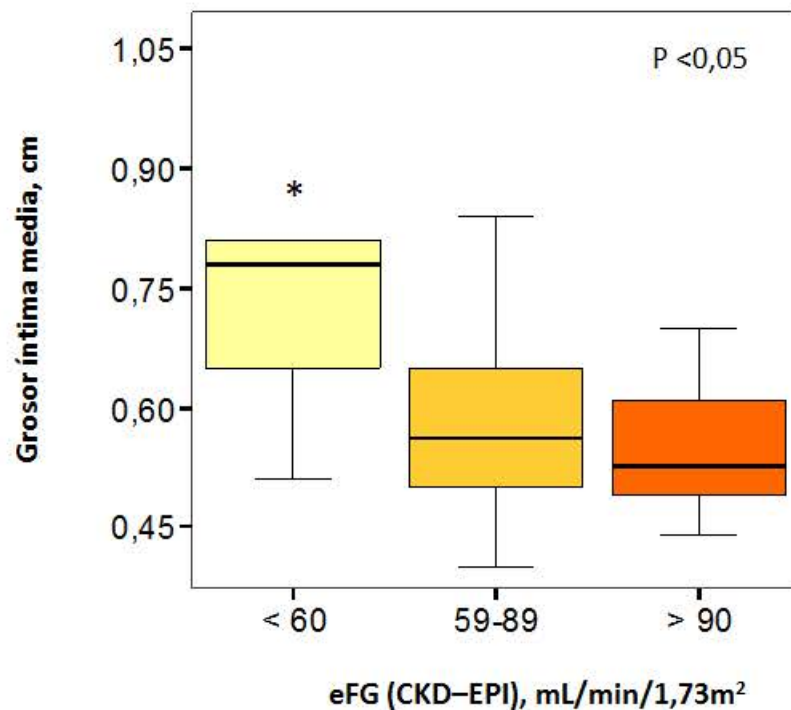


Figura 4.7. Grosor Intima media en relación al filtrado glomerular (CKD-EPI) en PVVIH.



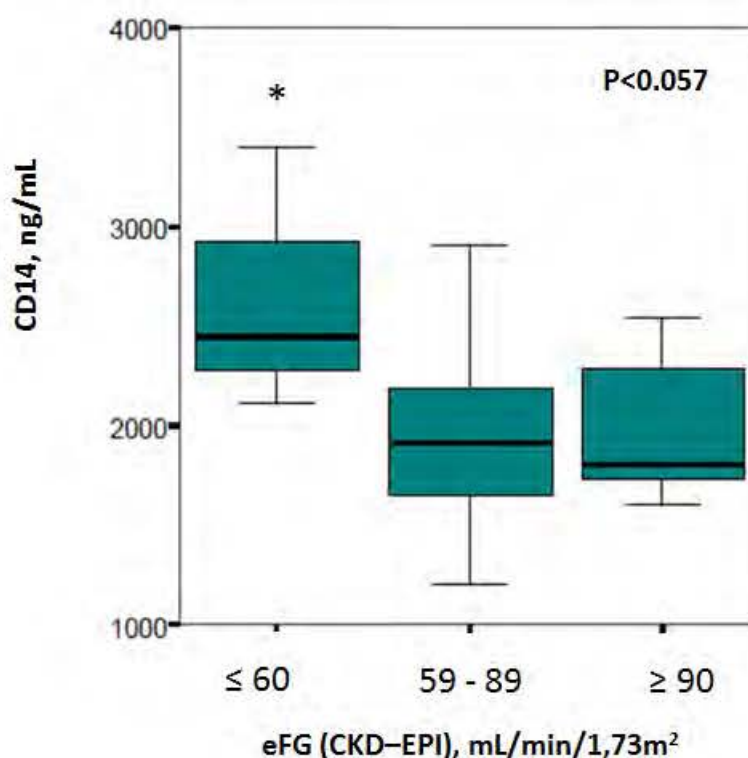


Figura 4.8 sCD14 en relación al filtrado glomerular (CKD-EPI) en PVIH.

En el análisis comparativo de los parámetros de la función renal entre los pacientes con niveles de TMAO por encima de  $5,16 \mu\text{M}$  tendieron a tener menor filtrado, cistatina C y creatinina, aunque únicamente los niveles de cistatina C mostraron diferencias significativas (tabla 4.7) que se mantuvieron tras un análisis multivariado (OR:  $-0.083$ , IC95%:  $0,04$ ;  $0,163$ ,  $P = 0,041$ ) (tabla 4.8).

Tabla 4.7. Distribución de los parámetros de función renal en función de sus niveles de TMAO.

	TMAO BAJO (TMAO $< 5,16 \mu\text{M}$ )	TMAO ALTO (TMAO $\geq 5,16 \mu\text{M}$ )	p
eFG (CKD – EPI), mL/min/1,73m <sup>2</sup>	81,5 $\pm$ 12,4	78,1 $\pm$ 13,5	0,221
Cistatina C, mg/dL	0,75 $\pm$ 0,10	0,84 $\pm$ 0,20	0,021
Creatinina, mg/dL	1,06 $\pm$ 0,15	1,10 $\pm$ 0,14	0,268
eFG $< 90$ mL/min/1,73 m <sup>2</sup> , n (%)	33 (80,5)	37 (84,1)	0,663

eFG: Filtrado glomerular estimado.  
Los datos se expresan como la media  $\pm$  DE

#### 4.3.4. Análisis multivariado de la relación entre los niveles de TMAO y la enfermedad cardiovascular y renal.

Se llevó a cabo un análisis multivariado para evaluar el efecto de las concentraciones plasmáticas de TMAO sobre la enfermedad cardiovascular y renal. Como variables independientes se seleccionaron aquellas que en el análisis univariado fueron estadísticamente significativas o que se consideraron clínicamente relevantes: DM, edad, HbA1c, nadir CD4/CD8, puntuación en la escala de Framingham y tratamiento antirretroviral. Dado que los valores de HbA1c están relacionados con la variable diabetes y en la ecuación de Framingham implícitamente engloba sexo, DM, edad, el ajuste se realizó únicamente con las variables nadir CD4/CD8, Framingham y tratamiento antirretroviral. Se decidió no hacer el ajuste con la variable presencia de placa de aterosclerosis dado el pequeño tamaño muestral: 1 paciente en el grupo TMAO < 5,16  $\mu\text{M}$  y 3 en el grupo TMAO  $\geq$  5,16  $\mu\text{M}$ .

Los niveles de cistatina C mostraron diferencias significativas que se mantuvieron tras un análisis multivariado (ver tabla 4.8). No hubo ninguna otra asociación significativa (ver tablas 4.8 y 4.9).

Tabla 4.8 Análisis univariado y multivariado variables resultado cuantitativas.				
	Univariado		Multivariado	
	Diferencias medias entre TMAO bajo y alto	p	Diferencia medias entre TMAO bajo y alto ajustada	p
GIMc, cm	-0,027 (-0,08 ; 0,03)	0,377	-0,015 (-0,77 ; 0,46)	0,618
CKD – EPI, mL/min/1.73m <sup>2</sup>	-3,47 (-2,13 ; 9,08)	0,221	-0,424 (-6,27 ; 5,43)	0,886
Cistatina C, mg/dL	-0,09 (-0,16 ; -0,01)	<b>0,021</b>	-0,083 (0,04 ; 0,163)	<b>0,041</b>
Creatinina, mg/dL	-0,035 (-0,10 ; 0,03)	0,268	0,008 (-0,06 ; 0,075)	0,825

a, ajustados por: meses de tratamiento, Framingham, nadir CD4-CD8

Tabla 4.9 Análisis univariado y multivariado variables resultado cualitativas.

	Univariado		Multivariado	
	OR IC95	p	OR IC95 Exp <sup>β</sup>	p <sup>β</sup>
Presencia de Placa, n (%)	3,0 (0,3- 30,3)	0,615	No aplica	
ECVs,(GIMc>p75 y/o o presencia de placa), n (%)	1,83 (0,65; 5,16)	0,252	1,154 (0,351; 3,798)	0,813
Eventos, n(%)	2,34 (0,58; 9,98)	0,316	1,105 (0,205; 5,939)	0,908
Filtrado glomerular < 90, n (%)	1,28 (0,42 ; 3,92)	0,778	0,837 (0,25 ; 2,80)	0,772
β, ajustados por: meses de tratamiento, Framingham , nadir CD4-CD8				

#### **4.4 Relación de TMA y la presencia de enfermedad cardiovascular, inflamación y enfermedad renal.**

El TMAO procede de la oxidación del TMA por la acción de las enzimas hepáticas. En este proyecto nos pareció interesante evaluar el papel que pudiera jugar el TMA en PVVIH en la enfermedad cardiovascular y renal. Para ello, los pacientes se clasificaron en dos grupos: pacientes con niveles de TMA por encima o por debajo de 6,61  $\mu\text{M}$  (que correspondía con el valor de la mediana). Los resultados están reflejados en la tabla 4.10.



Tabla 4.10. Características de pacientes VIH en función de niveles plasmáticos de TMA.

	TMA BAJO (TMA < 6,61 µM)	TMA ALTO (TMA ≥ 6,61 µM)	p
<b>Características basales</b>			
Edad, años	46 ± 11	48 ± 9	0,658
Varones, n (%)	34 (97,1)	29 (80,6)	<b>0,055</b>
Fumador, n (%)	13 (40,6)	14 (42,4)	0,329
Hipertensión, n (%)	4 (11,4)	6 (16,7)	0,735
PAS, mmHg	119 ± 17	117 ± 16	0,711
PAD, mmHg	72 ± 9	72 ± 10	0,386
<b>Perfil lipídico</b>			
Dislipemia, n (%)	182,9 ± 34,4	190,4 ± 44,06	0,435
Colesterol Total, mg/dL	47 ± 9	53 ± 13	0,031
cHDL, mg/dL	107 ± 33	109 ± 39	0,803
cLDL, mg/dL	133 (91-199)	120 (95 -187)	0,609
Triglicéridos, mg/dL	133 (91-199)	120 (95-187)	0,435
<b>Perfil glucémico</b>			
Diabetes mellitus, n (%)	6 (18,2)	4 (11,1)	0,405
Insulina, µU/mL	9,5 ± 6,4	13,8 ± 17,5	<b>0,009</b>
Glucosa, mg/dL	96,0 ± 14,3	95,3 ± 13,3	0,546
Resistencia a la insulina (HOMA)*, n (%)	8 (26,7)	9 (33,3)	0,583
Hemoglobina A1c, %	5,6 ± 0,5	5,6 ± 0,7	0,787
IMC, kg/m <sup>2</sup>	23,6 ± 2,9	23,8 ± 2,8	0,883
Síndrome metabólico, n (%)	4 (13,8)	2 (8,0)	0,675
<b>Parámetros relacionados con el VIH</b>			
Duración de la infección VIH, años	11 ± 6	11 ± 7	0,986
Tiempo de tratamiento, meses	97 (39 - 140)	82 (32 -147)	0,644
Linfocitos CD4, cel/mL	534 ± 213	559 ± 243	0,658
Nadir CD4, cel/mL	266 ± 150	279 ± 168	0,800
Linfocitos CD8, cel/mL	802 ± 307	847 ± 399	0,594
Ratio CD4/CD8	0,71 ± 0,29	0,84 ± 0,73	0,330
Nadir ratio CD4/CD8	0,32 ± 0,27	0,29 ± 0,26	0,650
Tiempo de tratamiento antirretroviral acumulado			
Exposición a IP, meses	77 (30 - 127)	59 (24 - 110)	0,570
Exposición a ITIAN, meses	179 (78 - 269)	122 (63 - 238)	0,214
Exposición a ITINAN, meses	47 (24 - 85)	35 (18 - 63)	0,183
Coinfección por VHC, n (%)	9 (26,5)	12 (35,3)	0,431

PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; IMC: índice de masa corporal; IP: inhibidores de la Proteasa; ITIAN: Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido; ITINAN: Inhibidores de la transcriptasa inversa No análogos de nucleósido.

\* Se define resistencia a la insulina cuando HOMA-R ≥ 3,6

Los datos se expresan como la media ± DE o la mediana (rango intercuartilo).

#### 4.4.1 Relación de TMA y la presencia de enfermedad cardiovascular.

No hubo diferencias en cuanto entre los dos grupos del estudio ni en perfil lipídico, ni en perfil glucémico, ni en la evaluación de riesgo por Framingham ni en las variables relacionadas con la infección por VIH, como se resume en la tabla 4.8.

Tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto al perfil de enfermedad cardiovascular entre los dos grupos del estudio (tabla 4.11):

<b>Tabla 4.11 Distribución de la ECV en pacientes VIH en función de sus niveles de TMA.</b>			
	<b>TMA BAJO</b> (TMA < 6,61 $\mu$ M)	<b>TMA ALTO</b> (TMA $\geq$ 6,61 $\mu$ M)	<b>P</b>
GIMc, cm	0,60 $\pm$ 0,12	0,59 $\pm$ 0,14	0,584
Presencia de Placa, n (%)	2 (50)	2 (50)	1,000
ECVs, n (%)	12 (63,2)	7 (36,8)	0,081
Eventos previos, n (%)	5 (55,6)	4 (44,4)	0,735
Framingham score bajo, n (%)	29 (82,9)	33(91,7)	0,307

*Los datos se expresan como la media  $\pm$  DE o la mediana (rango intercuartilo).*

GIMc: Grosor íntima-media carotídeo; ECV subclínica (ECVs): GIMc>p75 y/o presencia de placa.  
Framingham score bajo: <10% de probabilidad de sufrir un evento en los siguientes 10 años.

#### 4.4.2. Relación de los niveles de TMA con parámetros inflamatorios.

En la tabla 4.12 se resumen las determinaciones de los distintos biomarcadores evaluados. Los niveles altos de TMA no se asociaron significativamente con el dímero D, el fibrinógeno, la interleucina 6 de alta sensibilidad y la proteína C reactiva de alta sensibilidad.

<b>Tabla 4.12. Distribución parámetros inflamatorios y coagulación en pacientes VIH en función de niveles de TMA.</b>			
	<b>TMA BAJO</b> (TMA < 6,61 $\mu$ M)	<b>TMA ALTO</b> (TMA $\geq$ 6,61 $\mu$ M)	<b>P</b>
us PCR, mg/dL	0,14 (0,45- 0,50)	0,12(0,07 - 0,26)	0,979
IL-6, ng/mL	1,9 (1,90 - 3,39)	1,9 (1,90 - 2,29)	0,644
sCD14,ng/mL	1,93 $\pm$ 0,44	1,99 $\pm$ 0,45	0,687
D-Dímero, ng/mL	183 (115- 317)	139 (74 -332)	0,616
Fibrinógeno, mg/dL	330 $\pm$ 78	308 $\pm$ 70	0,295

*Los datos se expresan como la media  $\pm$  DE o la mediana (rango intercuartilo).*

#### 4.4.3. Relación de TMA y la presencia de enfermedad renal.

El grupo con TMA más alto tenía 30 pacientes con filtrado glomerular moderadamente disminuido (eFG < 90 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>). No se encontraron diferencias con respecto al TMA entre los pacientes con función renal normal o con función renal reducida (tabla 4.13).

**Tabla 4.13 Distribución de los parámetros de función renal en función de sus niveles de TMA.**

	<b>TMA BAJO</b> (TMA < 6,61 µM)	<b>TMA ALTO</b> (TMA ≥ 6,61 µM)	<b>P</b>
eFG (CKD – EPI), mL/min/1,73m <sup>2</sup>	79,0 ± 13,0	79,8 ± 13,0	0,794
Cistatina C, mg/dL	0,77 ± 0,11	0,79 ± 0,16	0,487
Creatinina, mg/dL	1,11 ± 0,13	1,05 ± 0,15	0,092
eFG<90 mL/min/1,73 m <sup>2</sup> , n (%)	29 (49,2)	30 (50,8)	0,957

eFG: Filtrado glomerular estimado.  
Los datos se expresan como la media ± DE

#### 4.3.4 Análisis multivariado de la relación entre los niveles de TMA y la enfermedad cardiovascular y renal.

Al igual que con el TMAO se realizó un análisis multivariado evaluando el efecto de los niveles de TMA y sobre cada una de las variables seleccionadas [variables resultado cuantitativas (GIMc, CKD-EPI, cistatina C y creatinina) y cualitativas (ECVs, eventos y filtrado glomerular inferior a 90 ml/min/1.73m<sup>2</sup>)] para evaluar el impacto sobre la presencia de enfermedad cardiovascular y renal. Se decidió no hacer el ajuste con la presencia de placa de ateroma dada o el pequeño tamaño muestral, 2 casos en el grupo de TMA < 6,61 µM y otros 2 en valores de TMAO ≥ 6,61 µM.

Las variables de confusión fueron elegidas por ser estadísticamente significativas o clínicamente relevantes en el análisis univariado: sexo, HDL y Framingham. Dado que en la ecuación de Framingham implícitamente engloba sexo y HDL, el ajuste se realizó únicamente en base al Framingham. En el análisis multivariado no se observaron asociaciones significativas con ninguna variable (ver tablas 4.14 y 4.15).

**Tabla 4.14 Análisis univariado y multivariado variables resultado cuantitativas.**

**Diferencias de medias ajustadas entre los dos grupos (niveles de TMAO en función de la mediana).**

	Univariado		Multivariado	
	Diferencias medias entre TMA alto y bajo	p	Diferencia medias entre TMA alto y bajo ajustada	p
GIMc, cm	-0,019 (- 0,088 ; 0,050)	0,584	0,002 (-0,061; 0,065)	0,949
CKD – EPI, ml/min/1.73m <sup>2</sup>	0,807 (-5,337 ; 6,952)	0,794	-0,399(-6,24; 5,44)	0,892
Cistatina C, mg/dl	0,025 (-0,048 ; 0,100)	0,487	0.033(-0,04 ; 0,105)	0,373
Creatinina, mg/dl	-0,057 (-0,124 ; 0,009)	0,952	-0,051 (- 0,118 ; 0,016)	0,134
a, ajustados por: Framingham				

**Tabla 4.15 Análisis univariado y multivariado variables resultado cualitativas.**

**Diferencias de medias ajustadas entre los dos grupos (niveles de TMAO en función de la mediana) junto a sus intervalos de confianza al 95%**

	Univariado		Multivariado	
	OR IC95	p	OR IC95 Exp <sup>B</sup>	p <sup>B</sup>
Presencia de Placa, n (%)	0,867 (0,114; 6,593)	1,000	No aplica	
ECVs,(GIMc>p75 y/o o presencia de placa), n (%)	0,373 (0,121 – 1,148)	0,081	-0,843 (0,133; 1,392)	0.159
Eventos, n(%)	0,750 (0,184; 3,06)	0,735	0,003 (0,217; 4,640)	0.997
Filtrado glomerular<90, n(%)	1,03 (0,30 – 3,58)	0,957	0,160 (0,333;4,142)	0,803
β, ajustados por: Framingham				



## 5. DISCUSIÓN



### **5.1 Relación de TMA y TMAO y la presencia de enfermedad cardiovascular.**

En población general existe una tendencia creciente a pensar que modificaciones en la composición y en la función de la microbiota intestinal podrían promover a largo plazo la aparición de enfermedad cardiovascular. El TMAO parece que podría ser un metabolito clave en este proceso ya que son numerosos los estudios que apuntan hacia una correlación positiva entre niveles de TMAO elevados y un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares sugiriendo así que podría ser un posible vínculo entre la dieta, la microbiota intestinal y la enfermedad cardiovascular (Tang, 2016).

En este estudio, se ha evaluado en PVVIH la relación entre los metabolitos TMA y TMAO y la aterosclerosis subclínica partiendo de la hipótesis de que un perfil cardiovascular más desfavorable se asociaría con una disminución de los niveles plasmáticos de TMA y un aumento de los niveles de TMAO. En nuestra cohorte de pacientes encontramos que niveles más altos de TMAO en plasma se asociaban con un mayor riesgo evaluado por el modelo de Framingham, no sucedía lo mismo con los niveles de TMA.

Tenemos presente que el uso de este modelo de Framingham en PVVIH es inexacto y que subestima sistemáticamente el riesgo de aterosclerosis subclínica y por lo tanto el riesgo de enfermedad cardiovascular en casi el 20% de los casos (Serrano-Villar, 2014). Al no disponer de muchos datos para poder comparar entre los modelos de predicción de riesgo y, además, considerando que los tiempos de seguimiento son cortos, no se ha alcanzado un consenso general de cuál sería el más conveniente para utilizar en la práctica clínica diaria en la población VIH (Petoumenos, 2014). Nosotros decidimos utilizar la ecuación de Framingham por ser uno de los modelos más frecuentemente utilizados tanto en la práctica diaria como en los estudios de investigación, así como por ser uno de los modelos recomendados por el panel de expertos de GESIDA.

Un análisis de la asociación entre pronóstico del riesgo y niveles de TMAO podría indicar que los niveles elevados de TMAO pueden ser predictores de un elevado riesgo CV, el cual puede verse influido por múltiples factores, entre ellos, la

edad ejerce un efecto muy relevante. En nuestro estudio hemos encontrado diferencias significativas en los niveles de TMAO en función de la edad de los pacientes. También hemos observado diferencias significativas entre los valores de TMAO y alteraciones del metabolismo hidrocarbonado. Los valores de TMAO por encima de la mediana se asociaron a valores mas altos de glucemia en ayunas, valores de HbA1C y una mayor proporción de pacientes diagnosticados de diabetes. Esta asociación entre TMAO y diabetes ha sido descrita previamente (Tang, 2013; Lever 2014), y sugiere el posible papel de la microbiota intestinal y sus metabolitos en las alteraciones del metabolismo de los hidratos de carbono, el desarrollo de diabetes y eventualmente, el incremento del riesgo cardiovascular. La baja proporción de pacientes con diabetes en nuestra muestra probablemente sea la causa que justifique una débil asociación.

En nuestra cohorte de pacientes VIH no se observó que variaciones en las concentraciones de TMA o TMAO en plasma se asocien a mayor existencia de aterosclerosis subclínica. Cabría la posibilidad de que las medidas de aterosclerosis subclínica que hemos elegido (GIMc, placas asintomáticas y ECV subclínica definida como GIMc mayor del percentil 75 y/o presencia de placa aterosclerótica) no reflejen procesos ateroscleróticos relacionados con TMAO, ya que diversos trabajos han relacionado el TMAO con el transporte inverso del colesterol y la activación plaquetaria (Koeth, 2013; Zhu, 2016). El GIMc es un marcador surrogado de enfermedad cardiovascular pero posee algunas limitaciones, al tratarse de un resultado en parte operador dependiente. Por otra parte, algunos estudios han mostrado que los valores de GIMc no son buenos predictores del riesgo CV (Carpenter M, 2016). La utilización de una variable combinada valores de GIMc y presencia de placa, como se hizo en nuestro estudio, se considera un mejor predictor de enfermedad CV que sólo el valor del GIMc (Naqvi TZ, 2014).

Sin embargo, nuestros resultados concuerdan con otros publicados en PVVIH. Otros autores han demostrado que PVVIH presentan niveles similares de TMAO a los controles sanos (Haissman, 2016; Miller, 2016). Estos trabajos tampoco han proporcionado una evidencia de que las concentraciones plasmáticas de TMAO elevadas tengan un impacto relevante sobre la carga aterosclerótica, la ECV



prevalente o los eventos adversos cardiovasculares (Srinivasa, 2015; Haissman, 2016; Miller, 2016).

La información sobre la función de la TMA (precursor del TMAO) y su impacto directo sobre la aterosclerosis es muy limitada. Nuestro trabajo amplía la medición de metabolitos bacterianos al TMA, mostrando que los niveles de TMA en los pacientes con VIH fueron más elevados que en los controles sanos, aunque tampoco se encontró una asociación con los marcadores de ECV subclínica. En contraste con nuestros resultados, el grupo de Srinivasa et al sí observaron una asociación significativa de los niveles de TMA con la presencia de placa calcificada coronaria pero no encontraron asociación con los niveles de TMAO. En los PVVIH los niveles TMA se asociaron con el número de placas calcificadas, puntuación de calcio, volumen y masa de placa y LPS. Aunque desconocemos con exactitud las razones a las que esto es debido, creemos que la razón fundamental son las diferencias en las características de los pacientes analizados por ejemplo en el estudio de Srinivasa et al se excluyeron pacientes con enfermedad cardíaca y renal conocida y algunos pacientes tenían carga viral detectable (Srinivasa, 2015).

Aunque el vínculo no está bien establecido, existe la posibilidad de que el TAR pudiera interferir en el metabolismo del TMAO, posiblemente induciendo a la acción de las enzimas FMO1 y FMO3 que son las dos principales enzimas hepáticas que catalizan de manera eficiente la formación de TMA lo que resultaría en una modificación de la conversión de TMA a TMAO (Missailidis, 2018). Al iniciar el TAR se producen cambios muy relevantes, como son la supresión de la replicación viral y la atenuación de la activación inmune, que a su vez podrían ser también la causa de los cambios observados en la producción y el metabolismo de TMAO. En nuestro estudio, los pacientes con más tiempo de tratamiento con ITIAN (principalmente tenofovir disoproxil fumarato) mostraron mayores niveles plasmáticos de TMAO, aunque no de TMA. Sin embargo, no se encontró asociación entre las concentraciones de TMA y TMAO y el uso de IP ni con ITINAN. En este mismo sentido, el grupo de Haissman, en un estudio de casos y controles, demostró una asociación entre los niveles de TMAO elevados y el inicio del TAR, especialmente en el tratamiento con IP (Haissman, 2016). Por otra parte, en el estudio de Srinivasa et al, más de la mitad de los pacientes con VIH habían recibido un régimen basado en IP, lo que podría originar la inhibición

de la actividad de enzimas que metabolizan fármacos hepáticos. Dentro de los IP, el uso de atazanavir podría afectar al metabolismo biliar. Estos autores tampoco observaron asociación entre niveles de TMA y el uso de IP, pero sí demostraron una asociación de TMA con el uso de ITINAN. Adicionalmente realizaron un análisis para evaluar la posible contribución de efavirenz, del que es conocido que afecta las enzimas hepáticas. Aunque el uso de efavirenz se asoció a mayores niveles de TMA, la relación de éste con las características de la placa coronaria persistió independientemente del uso del fármaco (Srinivisa, 2015). Es posible que el tipo de fármaco usado por los pacientes y la duración de este pudiera ejercer alguna influencia en la conversión de TMA a TMAO. Con los datos de nuestro estudio no es posible contestar con precisión a esta pregunta.

Missailidis et al evaluaron los niveles plasmáticos de TMAO en PVVIH antes y después de iniciar TAR, así como en pacientes con TAR efectivo a largo plazo. Aunque los niveles de TMAO se correlacionaron positivamente con el tiempo en tratamiento, se mantuvieron similares a los de controles sanos y no se vieron afectados significativamente por el régimen utilizado, el estado inmune o el grado de inflamación sistémica. En PVVIH bien controlados en TAR a largo plazo, los niveles de TMAO tampoco se asociaron a mayor riesgo cardiovascular (Missailidis, 2018).

Existen otros parámetros relacionados con la infección por VIH que se han asociado con el desarrollo y progresión de la aterosclerosis. Por ejemplo, la relación  $CD4/CD8 < 0,8$  se ha considerado un marcador de activación inmune y aparece como predictor de mortalidad por causas no asociadas al SIDA (Menozzi, 2014). En nuestro análisis la asociación de TMAO y TMA con el ratio  $CD4/CD8$  no fue significativa, aunque hay que tener presente que nuestros pacientes VIH tenían un buen control inmunológico.

Las concentraciones de TMAO en la sangre están afectadas por diversos factores como son la dieta, la composición y la actividad de la microbiota intestinal, la permeabilidad de la barrera intestinal, la actividad de las enzimas hepáticas y la tasa de excreción de metilaminas (ver figura 5.1) (Nowinski, 2018). En este sentido, diversos estudios han mostrado diferencias en la composición del microbioma intestinal de PVVIH en relación a sujetos no infectados, aunque con resultados muy

heterogéneos debido al tipo de pacientes estudiados (tratados versus no tratados), tipos de muestreo utilizados (esponja rectal, hisopo de heces, heces, biopsia tisular) y el nivel de clasificación bacteriana examinado (Brenchley, 2016). Además, en PVVIH podrían influir también otros factores como los años de infección por VIH, estado inflamatorio o el uso de drogas.



**Figura 5.1 Posibles factores que pueden influir en los niveles plasmáticos de TMAO.**

## **5.2 Relación de los niveles de TMA y TMAO con parámetros inflamatorios.**

La inflamación es un posible vínculo entre TMAO y la enfermedad cardiovascular. La aterosclerosis es un proceso predominantemente inflamatorio en el que está especialmente involucrado el sistema inmunológico por lo que hay un gran número de marcadores inflamatorios e inmunológicos que han sido propuestos como marcadores pronósticos, tanto en los síndromes coronarios agudos como en la enfermedad coronaria estable.

A pesar de la supresión viral y la estabilidad inmunológica, los biomarcadores de inflamación y coagulación permanecen elevados en un número significativo de pacientes con VIH y se asocian con puntuaciones más altas en los índices de

estratificación de riesgo (Mooney, 2015). En el estudio SMART, marcadores inmunes inespecíficos, IL-6, usPCR y dímero D, se asociaron con mayor riesgo de ECV, independientemente de otros factores de riesgo (Duprez, 2012). Tanto la IL-6 como el dímero D se han relacionado con la mortalidad por cualquier causa. El sCD14 es un marcador de la activación de monocitos y macrófagos, niveles más elevados se correlacionan con la aterosclerosis subclínica (McKibben, 2014) y la progresión de la misma según el incremento del GIMc (Kelesidis, 2012).

En nuestro análisis se evaluó el estado de la inflamación, la coagulación y activación de monocitos mediante la IL-6, usPCR, el dímero D, fibrinógeno y sCD14. No hemos encontrado asociación entre ninguno de estos biomarcadores y los niveles de TMAO. Esto invita a pensar que la elevación de los niveles de TMAO observada en pacientes con infección VIH en comparación con sujetos sanos, no posee una base inflamatoria. Cabe la posibilidad de que los niveles plasmáticos de los biomarcadores estudiados no sean suficientemente sensibles; muchos de los pacientes estudiados presentaban valores normales. Nuestra cohorte de pacientes está especialmente bien controlada, con valores de linfocitos CD4 elevada y cociente CD4/CD8 alto, lo que se suele asociar a menor traslocación bacteria e inflamación sistémica. Esta falta de asociación entre biomarcadores inflamatorios ha sido observada también en otros estudios. Nuestros resultados son consistentes con los obtenidos en estudios recientes realizados en individuos no VIH donde tampoco se encontraron correlaciones entre usPCR y TMAO (Kuhn, 2017; Rohrmann, 2016).

Se ha identificado microbiota que específicamente se relaciona con aumentos en marcadores de translocación microbiana e inflamación sistémica de pacientes VIH en regímenes de TAR (Dihn, 2015; Mutlu, 2014). Las alteraciones en la regulación de las células T asociadas al intestino en el VIH pueden dañar la barrera de la mucosa y favorecer la translocación bacteriana en el intestino con la posterior elevación de las endotoxinas bacterianas sistémicas, incluido el LPS. De hecho, el aumento de los niveles de LPS se ha asociado con la enfermedad aterosclerótica en pacientes VIH (Pedersen, 2013; Kelesidis, 2012). Existe evidencia de que las alteraciones en la microbiota intestinal pueden estar relacionadas con la enfermedad cardiometabólica, la inflamación y la aterosclerosis. En la cohorte de Srinivasa et al, los niveles de LPS

aumentaron y se asociaron positivamente con la TMA sérica ( $r = 0,19$ ,  $p = 0,03$ ), mientras que no encontraron asociación significativa con IL-6 y usPCR.

Missailidis et al no encontraron correlación entre los niveles de TMAO y los niveles de sCD14, LPS y dímero D. Shan et al observaron que el TMAO se correlacionó modestamente con los niveles sCD14 y sCD163 séricos pero no con la IL6 ni con la usPCR. Haissman et al estudiaron a PVVIH: 50 individuos no tratados y 50 con TAR y no encontraron asociaciones entre el TMAO y la función plaquetaria. El TMAO se asoció de forma independiente con sCD14 en los pacientes que no recibían tratamiento pero no se relacionó en pacientes tratados. No encontraron asociaciones entre TMAO y LPS o usPCR (Haissman, 2017).

En nuestro estudio no hemos cuantificado otros marcadores adicionales de activación inmune independientes de la translocación microbiana, como el LPS, ni hemos analizado la composición de la microbiota intestinal, lo que habría facilitado el análisis de efectos específicos producidos por la activación inmune en contraposición a los producidos por los efectos de la translocación microbiana y los niveles de TMAO.

### **5.3 Relación de TMA y TMAO y la presencia de enfermedad renal.**

Los pacientes con enfermedad renal crónica tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular más allá de los factores de riesgo tradicionales. Estudios recientes han sugerido la participación de la microbiota intestinal en la generación de metabolitos que muestran toxicidad urémica (Mafra, 2014). Niveles elevados se han relacionado con pacientes con una función renal alterada y también hay datos que apuntan a que puede estar relacionado con un aumento del riesgo CV en pacientes con enfermedad renal crónica (Bain, 2006; Tang, 2015; Missailidis, 2016; Stubbs, 2016; Mafune, 2016).

En experimentos realizados tanto en animales como en personas sobre el aclaramiento renal de TMA y TMAO se ha confirmado que los riñones son la vía

primaria de eliminación, con proporciones variables de los metabolitos TMA y TMAO en función de la cantidad (Zeisel, 1989; Al-Waiz, 1987).

Nuestra cohorte mayoritariamente no presentaba alteración de la función renal, con concentraciones séricas de creatinina y de cistatina C medias, normales. En nuestra población, la cistatina C y el CKD-EPI se correlacionaron significativamente con las concentraciones plasmáticas de TMAO, aunque no con TMA. En el resto de marcadores no se halló ninguna correlación con los niveles plasmáticos de TMAO y TMA. Considerando que se han encontrado valores de TMAO incrementados en pacientes con enfermedad renal crónica, sería razonable suponer que TMAO puede actuar como una toxina urémica derivada del intestino, hipotéticamente contribuyendo así a la inflamación sistémica y a la ECV. En modelos experimentales se ha demostrado que la administración de colina o TMAO a través de la dieta induce el desarrollo de fibrosis tubulointersticial y elevación de los niveles de cistatina C (Tang, 2015).

Los pacientes analizados en nuestro estudio tenían una buena función renal, seguramente por la juventud de la cohorte. Estudios previos han demostrado que los niveles elevados de TMAO aceleraron la disminución de la función renal y el aumento del riesgo cardiovascular en una población de pacientes con una tasa de filtrado glomerular eFG  $<60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (Tang, 2015). En el estudio de Stubbs et al. se observaron concentraciones incrementadas de TMAO solo en pacientes con enfermedad renal avanzada (Stubbs, 2016).

En nuestros resultados se observó que los pacientes con más tiempo de tratamiento con ITIAN (principalmente tenofovir disoproxil fumarato) mostraron mayores niveles plasmáticos de TMAO, aunque no de TMA. El tenofovir disoproxil fumarato (TDF) es uno de los fármacos antirretrovirales que ejerce mayor impacto en la salud renal y su uso prolongado se ha correlacionado con la reducción de la función renal a corto plazo. El TDF además de estar asociado con la disfunción tubular proximal también se asocia a una disminución del aclaramiento de creatinina o eFG (Palella, 2018). En la cohorte estadounidense de veteranos, el riesgo de desarrollar un eFG por debajo de 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> tomando una pauta que contenga TDF fue estadísticamente significativo en todos los subgrupos de pacientes

analizados exceptuando los pacientes que tenían una ERC previa o los pacientes diabéticos (condiciones fuertemente determinantes para desarrollar un eFG bajo). En los 10.841 veteranos estudiados cada año de exposición al TDF se asoció con un 34% más de riesgo de proteinuria, un 33% más de riesgo de ERC y un 11% más de rápido deterioro de la función renal (Scherzer, 2012). Por tanto debemos tener presente que el uso prolongado de TDF es un factor a tener en consideración dado que el TMAO se elimina vía renal, seguramente una mayor exposición a TDF está contribuyendo a una peor función renal y consecuentemente a un aumento de los niveles de TMAO.

En nuestro estudio, la función renal moderadamente alterada se asoció a niveles plasmáticos significativamente más altos de TMAO pero no se asoció a los niveles de TMA. Solo el 5,9% de los pacientes presentaron un deterioro de la función renal ( $eFG < 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ ). Las concentraciones plasmáticas de TMAO fueron más elevadas en los pacientes que presentaron deterioro de la función renal frente a los que no la tenían. Los pacientes con función renal reducida eran mayores, tenían un mayor grado de aterosclerosis subclínica, presentaron mayor tiempo de infección por VIH, mayor exposición al TAR, y menor ratio CD4/CD8. Nuestros resultados hacen pensar que el TMAO también podría ser un marcador de disfunción renal incipiente. De esta forma, en pacientes con función renal moderadamente reducida, el TMAO podría ser un marcador de riesgo cardiovascular en pacientes con infección VIH. No es posible con nuestros datos encontrar un claro nexo patogénico mediado por TMA/TMAO entre daño renal, enfermedad cardiovascular e infección VIH. Cabe la posibilidad que los metabolitos de la microbiota TMA/TMAO sean un factor más que contribuya a esta asociación, si bien por nuestros datos se podría deducir que su influencia es quizá poco relevante.

Los pacientes con función renal reducida eran mayores, mostraron mayor grosor íntima media y niveles plasmáticos de sCD14 más elevados. El sCD14 es segregado a partir de monocitos activados por lo que podría ser útil como un marcador tanto de activación de monocitos como de translocación microbiana. Los datos generados sugieren que la translocación microbiana se acompaña de alteraciones en la composición de la microbiota gastrointestinal (Lozupone, 2014; Dinh, 2015; Mutlu, 2014; Nowak, 2015). La asociación entre sCD14 y TMAO podría



implicar que la composición de la microbiota intestinal junto a la translocación microbiana pudiera provocar un fenotipo que produzca niveles de TMAO más elevados.

Nuestro estudio proporciona resultados mostrando una relación inversa del TMAO con eFG en el subgrupo de pacientes VIH con función renal moderadamente alterada.

### **5.4 Fortalezas y limitaciones del estudio.**

Entre las fortalezas de este estudio se incluyen el tratarse de un estudio detallado de múltiples factores en una cohorte extensa, bien caracterizada clínicamente. Esto amplía la limitada información de los efectos de las concentraciones de TMA y TMAO sobre la enfermedad cardiovascular y la función renal en una cohorte de pacientes VIH bien caracterizada. Hay muy pocos datos publicados sobre la función e impacto directo de la TMA sobre la aterosclerosis, (sin considerar su papel central como precursor del TMAO).

También como fortaleza, resaltar el desarrollo de protocolos específicos adaptados a la tecnología disponible para la medición de TMAO y TMA (LC-MS y GC-MS). De la misma forma, el preciso fenotipo de riesgo cardiovascular (estudio vascular que incluye determinación de GIMc y búsqueda de placas de ateroma) aporta una información valiosa sobre la asociación entre TMA/TMAO y riesgo cardiovascular.

Nuestro estudio presenta algunas limitaciones, principalmente por su diseño transversal y su tamaño muestral. Otra posible limitación es que no contamos con información sobre la ingesta dietética de colina en los días previos a la toma de muestra lo que podría influir directamente en los niveles plasmáticos de TMA y TMAO. Aunque en nuestro estudio los niveles de TMA y TMAO se midieron en ayunas, el grupo de Tang et al. informó que el TMAO plasmático aumenta durante aproximadamente 8 horas después de consumir la yema de huevo y el grupo de Miller



et al evidencio una fuerte relación dosis-respuesta entre el consumo de huevo y el TMAO plasmático (Miller, 2014).

En nuestro estudio no dispusimos de información relativa a la toma de antibióticos y existe evidencia de que su uso en el mes previo puede afectar a las concentraciones plásmaticas de TMAO (Tang, 2013).

Nuestros resultados solo pueden atribuirse a una población joven compuesta básicamente por hombres (más del 87%). Sería muy interesante disponer de resultados procedentes de cohortes formadas por más mujeres y por pacientes de mayor edad que presentaran un riesgo cardiovascular más elevado, así como con otras características sociodemográficas.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que tanto TMAO como TMA parecen tener un valor limitado como biomarcadores de enfermedad cardiovascular. Sin embargo el TMAO sí podría jugar un papel como marcador del deterioro de la función renal en pacientes con VIH. Estudios adicionales, prospectivos, multicentricos mayor tamaño muestral y mayor tiempo de seguimiento servirán para explorar la incorporación de estos biomarcadores a las estrategias de predicción del riesgo en la práctica clínica diaria.



## **6. CONCLUSIONES**



### 6.1 Conclusiones.

En este estudio se analizó la relación entre los niveles de TMAO y TMA con el riesgo cardiovascular y la función renal en nuestra cohorte de pacientes con infección VIH. Los resultados obtenidos nos permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. Los niveles de TMAO y TMA no se correlacionan ni con parámetros virológicos, ni inmunológicos.
2. Los niveles de TMAO, pero no los de TMA mostraron significación estadística con el uso de inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido. No se encontró asociación entre las concentraciones de TMAO y TMA con el uso de inhibidores de la proteasa ni con inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido.
3. Niveles altos de TMAO, no de TMA, se correlacionaban positivamente con el riesgo cardiovascular calculado por la ecuación de Framingham.
4. No se observó que variaciones en las concentraciones de TMAO o TMA en plasma se asocien a mayor existencia de aterosclerosis subclínica evaluada como GIMc, presencia placa o ECV subclínica.
5. Nuestros datos indican que los niveles plasmáticos de TMAO no contribuyen significativamente en el riesgo de enfermedad aterosclerótica temprana entre adultos VIH de mediana edad.
6. En nuestro análisis se evaluó la inflamación, la coagulación y activación de monocitos con IL-6, usPCR, el dímero D, fibrinógeno y sCD14 pero no se halló ninguna correlación con los niveles plasmáticos de TMAO y TMA.
7. Los niveles de TMAO se correlacionaron negativamente con el filtrado glomerular (CKD-EPI) y positivamente con los niveles de cistatina C.
8. La función renal alterada se asoció a niveles plasmáticos significativamente más altos de TMAO pero no al TMA.

Aunque no podemos excluir la posibilidad de que las concentraciones de TMAO y TMA puedan contribuir al desarrollo de enfermedad cardiovascular y deterioro de la función renal en PVVIH, nuestros datos no respaldan esta hipótesis. Sin embargo el TMAO sí podría jugar un papel en la monitorización del deterioro de la función renal en PVVIH. Estudios adicionales, prospectivos, multicéntricos, de mayor tamaño muestral y mayor tiempo de seguimiento servirán para explorar la incorporación de estos biomarcadores a las estrategias de predicción del riesgo en la práctica clínica diaria.

## **7. RESUMEN**





## **7.1 Resumen**

### **Estudio de la relación de los metabolitos bacterianos Trimetilamina N-óxido y Trimetilamina con la enfermedad cardiovascular y la función renal en pacientes infectados por VIH.**

#### **7.1.1 Introducción**

Los avances en la terapia antirretroviral para el tratamiento de la infección por VIH han supuesto un antes y un después en el manejo clínico y la calidad de vida de los pacientes, consiguiendo prolongadas supervivencias libres de enfermedad en la mayor parte de los pacientes que viven con VIH (PVVIH) (Duprez, 2009). Actualmente la enfermedad cardiovascular (ECV) es una de las principales causas de mortalidad en PVVIH presentando mayor riesgo que la población general. Los factores de riesgo tradicionales son responsables de una parte importante pero no son los únicos, también lo son la inflamación crónica causada por el VIH, la inmunodeficiencia y la posible acción directa de ciertos antirretrovirales (GEAM, 2014).

Es conocido que algunos metabolitos generados por la microbiota intestinal son proaterogénicos y que en PVVIH, incluyendo a los que controlan la replicación viral con TAR, la microbiota intestinal es muy distinta de la población no infectada. La disbiosis constante puede producir un impacto en la actividad inmunológica del intestino originando la difusión de bacterias e inflamación sistémica (Ufnal, 2015).

Los metabolitos de la fosfatidilcolina en la dieta son esenciales para ciertas funciones biológicas pero también parece que poseen cierto potencial aterogénico. La fosfatidilcolina dietética es una fuente importante de colina, que se metaboliza por la microbiota intestinal a trimetilamina (TMA). En el hígado, la TMA se oxida a trimetilamina-N-óxido (TMAO) (Tang, 2014; Ufnal, 2015).

La evidencia generada en población no VIH durante los últimos años sugiere que concentraciones plasmáticas de TMAO elevadas podrían tener un papel como un nuevo marcador de un mayor riesgo cardiovascular. Estudios clínicos apuntan hacia una correlación positiva entre elevados niveles plasmáticos de TMAO, no con el TMA, y un aumento del riesgo cardiovascular, independientemente de los factores de riesgo tradicionales. Una baja tasa de filtrado glomerular junto a otros factores de riesgo,

como son la hipertensión y la diabetes mellitus, fueron habituales en el cuartil superior de niveles plasmáticos de TMAO. (Tang, 2014; Ufnal, 2015).

Los niveles de TMAO también se han relacionado con enfermedades renales. Concentraciones elevadas de TMAO se han asociado con una disminución de la función renal en pacientes con ERC normalizándose tras el trasplante renal. Los niveles de TMAO correlacionaron un aumento de la inflamación sistémica y fueron un predictor independiente de la mortalidad en pacientes con ERC 3-5 (Missailidis, 2016).

### **7.1.2 Hipótesis y objetivos**

La hipótesis de nuestro estudio es que los niveles de TMAO y de TMA se relacionan con el riesgo cardiovascular y con el deterioro de la función renal en PVVIH. Se pretende evaluar la relación entre los niveles de TMAO y TMA con parámetros inmunológicos y virológicos relativos a la infección por VIH, exposición al tratamiento antirretroviral, factores de riesgo de ECV tradicionales y parámetros inflamatorios y de coagulación. También estudiar si existe una asociación entre los niveles de TMAO y TMA y la presencia de ECV analizada mediante marcadores surrogados como son el grosor de la íntima media carotídea (GIMc), la presencia de placa y la enfermedad cardiovascular subclínica (ECVs) así como con la función renal a través de la asociación con el filtrado glomerular estimado (eFG) por CKD-EPI.

### **7.1.3 Resultados**

Los niveles de TMAO y TMA no se correlacionaron con parámetros inmunológicos y virológicos relativos a la infección por VIH (CD4, CD8, ARN VIH-1 y ratio CD4/CD8), exposición al tratamiento antirretroviral, y factores de riesgo de ECV tradicionales. Destacar que niveles altos de TMAO, no de TMA, correlacionaron positivamente con el RCV calculado por Framingham ( $P < 0.037$  y  $r = 0,227$ ).

No se observó que variaciones en las concentraciones plasmáticas de TMA o TMAO se asociaran a una mayor existencia de aterosclerosis subclínica evaluada como GIMc, presencia de placa o ECV subclínica (GIMc mayor del percentil 75 y/o presencia de placa aterosclerótica).

En relación a la función renal, los niveles de TMAO se asociaron significativamente con la cistatina C. La función renal moderadamente alterada (eFG <60 ml/min/1,73m<sup>2</sup>) se asoció a niveles plasmáticos más altos de TMAO pero no se asoció a los niveles de TMA. Los pacientes con función renal reducida eran mayores, tenían la ACS incrementada, presentaron mayor tiempo de infección por VIH, mayor exposición al TAR menor ratio CD4/CD8 y mostraron niveles plasmáticos de sCD14 más elevados.

### **7.1.4 Conclusiones**

Nuestros datos no respaldan la hipótesis de que las concentraciones de TMAO y TMA puedan contribuir al desarrollo de ECV en PVVIH. Sin embargo valores elevados de TMAO, pero no de TMA, podrían ser un biomarcador de deterioro de la función renal en PVVIH. Estudios adicionales, prospectivos, multicéntricos, con mayor tamaño muestral, mayor tiempo de seguimiento servirán para explorar la incorporación de estos biomarcadores a las estrategias de predicción del riesgo en la práctica clínica diaria.



## **7.2 Summary**

### **Study of the relationship of bacterial metabolites Trimethylamine N-oxide and Trimethylamine levels with cardiovascular disease and renal function in HIV-infected patients.**

#### **7.2.1 Introduction**

The advances in antiretroviral therapy for HIV infection have been a before and after in the clinical management and quality of life of HIV patients, achieving prolonged disease-free survival (Duprez , 2009).

Currently, cardiovascular disease (CD) is one of the main causes of mortality in PLHIV, presenting a higher risk than general population. The traditional risk factors are responsible for a relevant part but are not the only ones, also are the chronic inflammation caused by HIV, immunodeficiency and the possible direct action of certain antiretroviral drugs (GEAM, 2014).

It is known that some metabolites generated by the intestinal microbiota are proatherogenic and that in PLHIV the intestinal microbiota is very different from the non-infected population, including those patients well controlled with TAR. Continuous dysbiosis can produce an impact on the immunological activity of the intestine, causing bacterial diffusion and systemic inflammation (Ufnal, 2015).

Metabolites of diet phosphatidylcholine are essential for certain biological functions but also appear to have certain atherogenic activity. Dietary phosphatidylcholine is an important source of choline, which is metabolized by intestinal microbiota to trimethylamine (TMA). In the liver, the TMA is oxidized to trimethylamine-N-oxide (TMAO) (Tang, 2014; Ufnal, 2015).

The evidence generated in the non-HIV population during the last years suggests that high plasma concentration of TMAO may have a role as a new marker of increased cardiovascular risk. Clinical trials indicate a positive correlation between elevated plasma TMAO levels, not TMA, and increased cardiovascular risk, regardless of traditional risk factors. A low glomerular filtration rate together with other risk

factors, such as hypertension and diabetes mellitus, were common in the highest quartile of plasma TMAO levels (Tang, 2014, Ufnal, 2015).

Variations in TMAO levels have also been related to kidney disease. Elevated TMAO levels were strongly associated with decrease of renal function in CKD and were normalized after renal transplantation. TMAO levels correlate with increased systemic inflammation and is an independent predictor of mortality in CKD 3-5 patients (Missailidis, 2016).

### **7.2.2 Hypotheses and objectives**

In this study we have hypothesized that plasma levels of TMAO and TMA could be related to cardiovascular risk and to renal function deterioration in a cohort of patients with HIV infection. We evaluated the relationship between TMAO and TMA levels with immunological and virological parameters related to HIV infection, with antiretroviral treatment exposure, with traditional CVD risk factors and with inflammatory and coagulation parameters. Also we assess the association between the levels of TMAO and TMA with the presence of cardiovascular disease analyzed by surrogate markers of cardiovascular disease such as the thickness of the intima media carotidea (cIMT), the presence of plaque and subclinical cardiovascular disease as well as with renal function through association with glomerular filtration estimated by CKD-EPI equation.

### **7.2.3 Results**

The TMAO and TMA levels did not correlate with immunological and virological parameters related to HIV infection (CD4, CD8, HIV-1 RNA and CD4 /CD8 ratio), with exposure to antiretroviral treatment, or with traditional CVD risk factors. Note that high levels of TMAO, not TMA, correlated positively with the cardiovascular risk scored by Framingham ( $P < 0.037$  and  $r = 0.227$ ).

In our cohort, we have not found an association between plasma concentrations of TMAO or TMA with the presence of subclinical atherosclerosis evaluated as cIMT,

presence of plaque or subclinical CVD (cIMT higher than the 75th percentile and / or evidence of atherosclerotic plaque).

In regards to renal function, higher TMAO levels were significantly associated to cystatin C concentrations. Moderately impaired renal function (eGFR <60 ml/min/1.73m<sup>2</sup>) was associated with significantly higher plasma TMAO levels but was not associated with TMA levels. Patients with reduced renal function were older, had more frequently subclinical atherosclerosis, presented longer time of HIV infection, had longer ART exposure, lower CD4 / CD8 ratio, and had higher plasma levels of sCD14 (p <0.05).

### **7.2.4 Conclusions**

Our data do not support the hypothesis that TMAO and TMA concentrations may contribute significantly to the development of cardiovascular disease in PLHIV. However, TMAO, but not TMA, seems to be a marker of renal function deterioration in PLHIV. Additional, prospective, multicenter studies, sample size and longer follow-up period will serve to explore the incorporation of these biomarkers into risk prediction strategies in the daily clinical practice.





## 8. ANEXOS



9.1 Consentimiento informado.

**ESTUDIO “VALORACIÓN DEL RIESGO CARDIOVASCULAR SUBCLÍNICO EN PACIENTES CON INFECCIÓN POR VIH MEDIANTE PRUEBAS NO INVASIVAS: GROSOR ÍNTIMA-MEDIA CAROTÍDEO, MODELO SCORE Y USO DE BIOMARCADORES SÉRICOS”.**

**DOCUMENTO DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO.**

Se le ofrece participar en un estudio para analizar con detalle el riesgo que sufre de padecer enfermedad cardiovascular, como infarto de miocardio o accidente cerebrovascular.

**Algunos datos sobre su enfermedad**

Desde 1996, la utilización de introducción de tratamientos de alta eficacia para el virus VIH (TAR) ha supuesto un cambio fundamental en la evolución de su enfermedad. En los pacientes que siguen el tratamiento correctamente, actualmente se puede considerar una enfermedad crónica. Esto supone que la mortalidad relacionada con la enfermedad ha disminuido mucho. Pero a la vez, están apareciendo algunos efectos adversos debido a estas medicinas y la duración prolongada de la enfermedad y de la infección crónica. Entre los efectos adversos más importantes destaca el incremento de sufrir enfermedad cardiovascular. Identificar a los pacientes que sufren mayor riesgo de presentar infartos de miocardio o enfermedad cerebrovascular es importante para poder prevenir su aparición con el paso del tiempo.

**¿Cómo conocer quién presenta riesgo de padecer enfermedad cardiovascular?**

La manera más fiable de averiguar quién tiene más posibilidades de desarrollar una enfermedad cardiovascular es mediante técnicas invasivas y costosas, a menudo no exentas de riesgos para el paciente que se somete a ellas. Por ello se han desarrollado diferentes métodos no-invasivos, como el estudio del grosor de la arteria carótida del cuello mediante ecografía, así como el uso de ecuaciones matemáticas y la determinación de biomarcadores en sangre. Sin embargo, todavía no se conoce

bien si estos métodos, que han demostrado ser útiles en la población general, son también aplicables a los pacientes con infección por el virus VIH.

**¿Qué son los biomarcadores?**

Son moléculas sintetizadas por nuestro organismo cuyos niveles aumentan en las personas con más riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular.

**¿Cuál es el propósito del estudio?**

Pretendemos averiguar si el uso de una ecuación matemática (modelo SCORE), que tiene en cuenta diferentes datos (edad, sexo, consumo de tabaco, presión arterial y niveles de colesterol), así como la determinación de biomarcadores en sangre puede ayudarnos a conocer su riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular en el futuro.

**¿En qué consiste el estudio?**

Si decide participar, el médico le realizará una historia clínica y una exploración física. Se hará un análisis de sangre y orina coincidiendo con la próxima analítica para determinar distintos biomarcadores. Además, se medirá mediante ecografía del cuello el grosor de la arteria carótida.

**¿Tengo necesariamente que participar?**

Usted es libre. Puede decidir participar o no. Si decide participar y en cualquier momento cambia de opinión por cualquier motivo, podrá decírselo al personal investigador. Tiene derecho a retirarse del estudio. Su decisión de participar o no, o su decisión de interrumpir su participación no influirá en la relación con su médico ni en la calidad de la atención sanitaria que recibe ahora y en el futuro.

**¿Cuáles son los posibles beneficios de mi participación?**

La información que se obtenga del estudio y las conclusiones pueden aumentar el conocimiento que tenemos sobre las complicaciones de su enfermedad y tratamiento. En un futuro tanto usted como otras personas con su misma enfermedad, podrían beneficiarse de ello. Los resultados del estudio no necesariamente pueden ofrecerle un beneficio práctico.

**¿Existe alguna contraindicación para la participación en el estudio?**

No pueden participar los pacientes que tengan enfermedad cardiovascular conocida: antecedentes de ictus, infarto de miocardio, enfermedad renovascular de origen aterosclerótico, claudicación intermitente

**¿Se respetará la confidencialidad de mi participación en el estudio?**

Durante este estudio, se recogerán datos de usted. Estos datos se manejarán de acuerdo con la Ley Orgánica de protección de datos de carácter personal 15/1999. Toda la información sobre usted, relacionada con este estudio, se tratará con la más estricta confidencialidad. Solo la conocerán su médico y los responsables del estudio. Solo se utilizarán para la evaluación científica del estudio.

**Contactos para obtener más información:**

En caso de que tenga alguna duda relativa al estudio, consulte a su médico.

Nombre del médico:.....

Teléfono de contacto:.....

**Formulario de consentimiento informado**

**Yo, (nombre y apellidos).....**

**He leído la hoja de información sobre el estudio “Valoración del riesgo cardiovascular subclínico en pacientes con infección por VIH mediante pruebas no invasivas: grosor íntimamedia carotídeo, modelo SCORE y uso de biomarcadores séricos”**

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio

He hablado con el doctor: ..... y he recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas.

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

También he sido informado de forma clara, precisa y suficiente de que los datos serán tratados con respeto a mi intimidad y a la normativa vigente de protección de datos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio. Recibiré una copia firmada de esta hoja de información al paciente y consentimiento informado.

Firma del paciente:

Fecha:

Firma del investigador:

Fecha:

## 9.2 Abstract.

Se adjunta abstract de resultados enviado al congreso: EACS, 16th European AIDS Conference, Milan, Italia. 25-27 Octubre, 2017.

### **RELATIONSHIP BETWEEN TMAO AND TMA PLASMA LEVELS WITH THE PRESENCE OF KIDNEY DYSFUNCTION AND CARDIOVASCULAR DISEASE IN HIV INFECTED PATIENTS**

NURIA SÁNCHEZ-VEGA<sup>1</sup>, ADRIANA ORTEGA-HERNÁNDEZ<sup>2</sup>, ISABEL ORTEGA-MADUEÑO<sup>3</sup>, MANUEL FUENTES-FERRER<sup>4</sup>, JUNCAL PEREZ SOMARRIBA<sup>5</sup>, DULCENOMBRE GÓMEZ-GARRE<sup>2</sup>, VICENTE ESTRADA<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Hospital Clínico San Carlos-Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos (IdISSC) Universidad Complutense, Madrid; <sup>2</sup>Laboratorio de Biología Vascular, Hospital Clínico SanCarlos-IdISSC-CIBERCV; <sup>3</sup>Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Clínico San Carlos IdISSC; <sup>4</sup>Preventive Medicine Department, Hospital Clínico San Carlos-IdISSC; <sup>5</sup>Infectious diseases. Hospital Clínico San Carlos-IdISSC, Madrid, Spain.

**BACKGROUND.** HIV-infected patients present increased incidence of cardiovascular disease (CVD) and higher risk of chronic kidney disease (CKD). Gut microbiome metabolite trimethylamine-N-oxide (TMAO), formed from dietary trimethylamine (TMA), has shown to be proatherogenic. In addition, TMAO levels have been linked to decreased renal function. HIV infection has been associated with gut microbiota dysbiosis and epithelial permeability as potential proatherogenic mechanisms in this population. In this study, we have assessed the relationship between TMAO and TMA with the presence of kidney dysfunction and CVD in HIV-infected patients.

**METHODS.** Eighty-five HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy (ART), with undetectable HIV-RNA (<50 copies) were included. TMAO and TMA were measured by liquid and gas chromatography tandem mass spectrometry, respectively. Carotid intima-media thickness (cIMT) was measured by ultrasonography, and estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated by CKD-EPI equation.

Impaired renal (IR) function was established as eGFR<60 mL/min/1.73m<sup>2</sup>, according to the US National Kidney Foundation Guidelines.

**RESULTS.** Most patients, 17.6 and 76.5% displayed normal (eFG>90) or reduced (eFG 60-90) kidney function respectively; 5.9% presented IR function. IR patients presented longer time of HIV infection, longer ART exposure, and lower CD4 nadir and CD4/CD8 ratio. No differences were found regarding TMA between groups. However, TMAO plasma levels were higher in IR patients than in non-IR [11.4 (4.2-20.2) vs 7.3 (2.6-8.39  $\mu$ M)], showing a significant correlation with eGFR ( $r=-0.230$ ,  $P=0.033$ ). IR patients were older ( $61\pm 13$  vs.  $47\pm 9$  years,  $P<0.005$ ), and had increased subclinical atherosclerosis (cIMT:  $0.76\pm 0.20$  vs.  $0.58\pm 0.11$  mm,  $P<0.05$ ). In addition, IR patients also showed higher CD14 plasma levels ( $2.7\pm 0.7$  vs  $1.9\pm 0.4$  ng/mL,  $P<0.05$ ), a marker of gut permeability.

**CONCLUSION.** In HIV-infected patients, plasma levels of TMAO are associated with impaired renal function as well as with increased cIMT. Whether TMAO could be a novel cardiorenal risk factor in this population deserves further studies.



9.3 **Poster.**

Se adjunta poster de resultados presentado en el congreso: EACS, 16th European AIDS Conference, Milan, Italia. 25-27 Octubre, 2017.

**Relationship between TMAO and TMA plasma levels with the presence of kidney dysfunction and cardiovascular disease in HIV infected patients.**

Ruiza Sánchez-Vega<sup>1</sup>, Adriana Ortega-Hernández<sup>2</sup>, Isabel Ortega-Molina<sup>3</sup>, Manuel Fuentes-Fernández<sup>4</sup>, Juncal Pérez-Samartín<sup>5</sup>, Dolores María Gómez-Gerrea<sup>6</sup>, Vicente Estrada<sup>6</sup>.

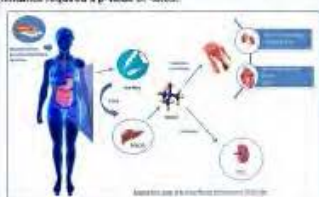
<sup>1</sup>Hospital Clínico San Carlos-Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos (IISCC) Universidad Complutense, Madrid; <sup>2</sup>Laboratorio de Biología Molecular, Hospital Clínico San Carlos-IISCC-CIBERCV; <sup>3</sup>Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Clínico San Carlos IISCC; <sup>4</sup>Preventive Medicine Department, Hospital Clínico San Carlos-IISCC; <sup>5</sup>Infectious Diseases, Hospital Clínico San Carlos-IISCC, Madrid, Spain

**BACKGROUND**

HIV-infected patients present increased incidence of cardiovascular disease (CVD) and higher risk of chronic kidney disease (CKD). Gut microbiota develops critical roles in chronic inflammatory diseases, including obesity, type 2 diabetes, insulin resistance, atherosclerosis and nonalcoholic fatty liver disease. Gut microbiome metabolite trimethylamine-N-oxide (TMAO), formed from dietary choline/lecithin (TMA), has shown to be proatherogenic. In addition, TMAO levels have been linked to decreased renal function. HIV infection has been associated with gut microbiota dysbiosis and epithelial permeability as potential proatherogenic mechanisms in this population. In this study, we have assessed the relationship between TMAO and TMA with the presence of kidney dysfunction and CVD in HIV-infected patients.

**MATERIAL AND METHODS**

Eighty-five HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy (ART), with undetectable HIV-RNA (<50 copies) were included. Informed written consent was obtained. All participants were recruited at Hospital Clínico San Carlos (Madrid). TMAO and TMA were measured by liquid and gas chromatography tandem mass spectrometry, respectively. Carotid intima-media thickness (cIMT) was measured by ultrasonography (HD7 model, Philips Medical Systems, Inc., Eindhoven, The Netherlands) and interpreted using the Mannheim criteria. Estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated by CKD-EPI equation. Impaired renal (R) function was established as eGFR<60 mL/min/1.73m<sup>2</sup>, according to the US National Kidney Foundation Guidelines. 10-year CV risk score was estimated by Framingham algorithm. Statistical data analysis was performed using SPSS 17.0. Univariate correlation and multivariate linear regression analyses were utilized to estimate associations between plasma TMAO levels and demographics and HIV clinical parameters, ART and CVD risk factors. Statistical significance required a p-value of <0.05.



**RESULTS**

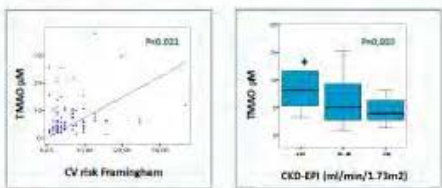
The study population included 85 HIV infected subjects. Patient characteristics, demographics and clinical details are described in table 1. Plasma TMAO and TMA levels were not significantly correlated with accumulated ART exposure, including PI, INSTI, NRTI and NNRTI.

Characteristic	Value	Characteristic	Value
Age (years)	47 ± 13	Inflammatory and coagulation markers	
Gender (male %)	74 (87)	Lactate (mg/dL)	0.195 (0.04-0.48)
Dyslipidemia (%)	69 (79)	C-reactive protein (mg/L)	0.14 (0.01-0.29)
Hyperuricemia (%)	74 (87)	CD4 count (cells/mm <sup>3</sup> )	1,07 ± 434
Diabetes mellitus (%)	11 (13)	D-Dimer (mg/dL)	121 (60-648)
Current smoker (%)	11 (13)	Fibrinogen (mg/dL)	320 (284-462)
ART/PI	34 (39)	HIV-related parameters	
ART/INSTI	34 (39)	eGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	11 (9-14)
ART/NNRTI	17 (20)	Timepoint duration (months)	88 (39-142)
Total cholesterol (mg/dL)	207 ± 54.4	Current CD4 count (cells/mm <sup>3</sup> )	648 ± 212
HDL cholesterol (mg/dL)	30 ± 11	Time (CD4 cells/mm <sup>3</sup> )	289 (80-907)
LDL cholesterol (mg/dL)	120 ± 37	CD4/CD8 ratio (range, %)	1.80 (0.5-6.18)
Triglyceride (mg/dL)	111 (13-132)	Microbiome diversity	
Framingham score (%)		Shannon diversity	16 (8-18)
- Low risk (predicted CVD risk <10%)	80 (97)	- Bifidobacterium	123 (64-178)
- Moderate risk (CVD risk 10-20%)	10 (12)	- Bacteroidetes	102 (7-16)
- High risk (CVD risk >20%)	5 (6)	- Bifidobacterium (high level)	18 (10-25)
CD4-EPI (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	70.7 ± 33.0	- Clostridia (high level)	18 (10-25)
Overall CVD risk	0.40 ± 0.34		

Table 1. Data reported as mean (standard deviation) or range. Abbreviations as in text.

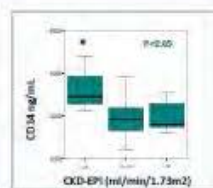
**RESULTS**

Most patients, 27.6 and 76.5% displayed normal (eGFR>90) or reduced (eGFR 60-90) kidney function respectively; 5.9% presented impaired renal function. IR patients presented longer time of HIV infection [15(13-18) vs 11(4-15) years], longer ART exposure [117(73-148) vs 86(33-139)months], and lower CD4/CD8 ratio [0.62(0.51-0.74) vs 0.80(0.45-0.99)]. No differences were found regarding TMA between groups. However, TMAO plasma levels were higher in impaired renal patients than in non impaired renal [11.4 (4.2-20.2) vs 7.3 (2.6-8.39) µM], showing a significant correlation with eGFR (r=-0.230, P=0.033). Impaired renal patients were older [51±13 vs 47±9 years, P=0.005], and had increased subclinical atherosclerosis (cIMT: 0.76±0.20 vs 0.58±0.11 mm, P<0.05). TMAO levels are correlated with CV risk calculated by Framingham score (P=0.021).



No differences in systemic inflammatory or coagulation markers were found; TMAO and TMA levels were no significant associated with D-dimer, fibrinogen, high sensitivity interleukin 6 and high-sensitivity C-reactive protein.

IR patients showed higher plasma CD14 levels (2.7±0.7 vs 1.9±0.4 ng/mL, P=0.05), a marker of gut permeability.



**CONCLUSIONS**

In this pilot study of HIV+ population:

- No differences were found regarding TMA between groups of IR function.
- Plasma levels of TMAO are associated with impaired renal function.
- CD4 count and CD4/CD8 ratio were not predictive of higher TMAO levels.
- TMAO levels are correlated with CV risk estimated by Framingham algorithm.
- Whether TMAO could be a novel cardiovascular risk factor in this population deserves further studies.

References:  
 1. Sánchez-Vega R, et al. Plasma levels of TMAO in HIV-infected patients is associated with various levels of circulating proinflammatory cytokines. AIDS 2014; 28:468-470.  
 2. Valasek et al. Microbiota-dependent marker: TMAO is associated to atherothrombotic risk in non-dialysis patients with chronic kidney disease. In: HIV Infection: A Practical Approach, Oxford: OUP, 2014; 230-238.  
 3. Salsaf et al. Trimethylamine N-Oxide, the Microbiome, and Heart and Kidney Disease. Annual Review of Public Health 2014; 35:237-251.



## 9. BIBLIOGRAFÍA



**9.1 Bibliografía.**

Abraham AG, Althoff KN, Jing Y y col. North American AIDS Cohort Collaboration on Research and Design (NA-ACCORD) of the International Epidemiologic Databases to Evaluate AIDS (IeDEA): End-stage renal disease among HIV-infected adults in North America. *Clin Infect Dis.*2015. 60: 941–949.

ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2013.

Akosah KO, McHugh VL, Barnhart SI y col. Pilot results of the Early Detection by Ultrasound of Carotid Artery Intima-Media Thickness Evaluation (EVALUATE) study *Am J Hypertens*, 20 (2007), pp. 1183-1188.

Akosah KO, Schaper A, Cogbill C y col. Preventing myocardial infarction in the young adult in the first place: how do the National Cholesterol Education Panel III guidelines perform? *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:1475-1479.

Al-Waiz M, Mitchell SC, Idle JR y col. The metabolism of <sup>14</sup>C-labelled trimethylamine and its N-oxide in man. *Xenobiotica.*1987.17:551–58.

Al-Waiz M, Mikov M, Mitchell SC y col. The exogenous origin of trimethylamine in the mouse. 1992, *Metabolism* 41(2):135–36.

American Heart Association (AHA). *Heart Disease and Stroke Statistics —2007 Update.* Dallas, Texas: American Heart Association; 2007.

Anderson CW y col. DNA damage and the DNA-activated protein kinase. 1993. *Trends Biochem Sci.* 1993;18(11):433-7.

Anderson PL, Lichtenstein KA, Gerig NE y col. Atazanavir-containing renal calculi in an HIV-infected patient. *AIDS.* 2007, 21:1060–1062.

- Anthoni, U, Christophersen C, Gram L y col. Poisonings from flesh of the Greenland shark *Somniosus microcephalus* may be due to trimethylamine. *Toxicol* 1991, 29, 1205–1212.
- Antiretroviral Therapy Cohort collaboration; Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet*. 2008 26;372(9635):293-9.
- Arildsen H, Sørensen KE, Ingerslev JM y col. Endothelial dysfunction, increased inflammation, and activated coagulation in HIV-infected patients improve after initiation of highly active antiretroviral therapy. *HIV Med* 2013;14(1): 1-9.
- Baigent C, Landray MJ, Reith C y col. The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): a randomized placebo-controlled trial. *Lancet*. 2011;377:2181–2192.
- Bain MA, Faull R, Fornasini y col. Accumulation of trimethylamine and trimethylamine-N-oxide in end-stage renal disease patients undergoing haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:1300–4.
- Bain MA, Fornasini G, Evans AM. y col. Trimethylamine: metabolic, pharmacokinetic and safety aspects. 2005 *Curr. Drug Metab.* 6:227–40.
- Baker J, Ayenew W, Quick H y col. High-density lipoprotein particles and markers of inflammation and thrombotic activity in patients with untreated HIV infection. *J Infect Dis.* 2010;201(2):285–92.
- Balamuthusamy S, Srinivasan L, Verma M y col. Renin angiotensin system blockade and cardiovascular outcomes in patients with chronic kidney disease and proteinuria: a meta-analysis. *Am Heart J.* 2008;155:791–805.
- Balderson BH, Grothaus L, Harrison RG y col. Chronic illness burden and quality of life in an aging HIV population. *AIDS Care.* 2013;25:451–458.

- Ballocca F, Gili S, D'Ascenzo F y col. HIV infection and primary prevention of cardiovascular disease: lights and shadows in the HAART Era. *Prog Cardiovasc Dis* 2016;58:565-576.
- Bell JD, Lee JA, Lee HA y col. Nuclear magnetic resonance studies of blood plasma and urine from subjects with chronic renal failure: identification of trimethylamine- N-oxide. *Biochim. Biophys. Acta* 1991; 1096:101–7.
- Bennett BJ, de Aguiar Vallim TQ, Wang Z y col. Trimethylamine-n-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis, exhibits complex genetic and dietary regulation. *Cell Metab.* 2013; 17:49–60.
- Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W y col. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med.* 1998;338:1650-1656.
- Berger JS, Jordan CO, Lloyd-Jones D y col. Screening for cardiovascular risk in asymptomatic patients. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:1169-1177.
- Bhaskaran K, Hamouda O, Sannes M y col. Changes in the risk of death after HIV seroconversion compared with mortality in the general population *JAMA*, 300 (2008), pp. 51-59.
- Bittencourt MS, Peixoto D y col. Atherosclerosis in HIV patients: A different disease or more of the same? *Atherosclerosis* 2015; 240(2): 333-4.
- Bloomfield GS, Hogan JW, Keter A y col. Hypertension and obesity as cardiovascular risk factors among HIV seropositive patients in Western Kenya. *PLoS One.*2011;6(7).
- Borges AH, O'Connor JL, Phillips AN y col. Interleukin 6 is a stronger predictor of clinical events than high-sensitivity C-reactive protein or D-dimer during HIV infection. *J Infect Dis.* 2016;214:408–16.

- Brenchley JM, Price DA, Schacker TW y col. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 2006;12:1365–71.
- Brenchley JM, Mudd JC y col. Gut mucosal barrier dysfunction, microbial dysbiosis, and their role in HIV-1 disease progression. *J. Infect. Dis.* 2016, 214, 58–66.
- Brewster UC, Perazella MA y col. Acute interstitial nephritis associated with atazanavir, a new protease inhibitor. *Am J Kidney Dis* 44: e81– e84, 2004.
- Brown TT, Cole SR, Li X y col. Antiretroviral therapy and the prevalence and incidence of diabetes mellitus in the multicenter AIDS cohort study. *Arch Intern Med.* 2005;165:1179–1184.
- Calvo M, Martinez E y col. Update on metabolic issues in HIV patients. *Curr Opin HIV AIDS* 2014; 9: 332-9.
- Calza L, Manfredi R, Chiodo F y col. Hyperlipidaemia in patients with HIV- infection receiving highly active antiretroviral therapy: epidemiology, pathogenesis, clinical course and management. *IntJAntimicrobAgents.*2003;22(2):89–9.
- Carballo D, Delhumeau C, Carballo S y col. Swiss HIV Cohort Study and AMIS registry Increased mortality after a first myocardial infarction in human immunodeficiency virus-infected patients; a nested cohort study. *AIDS Res Ther.* 2015;12:4.
- Carter GM, Esmaili A, Shah H y col. Probiotics in Human Immunodeficiency Virus Infection: A systematic review and evidence synthesis of benefits and risks. *Open Forum Infect. Dis.* 2016, 3, ofw164.
- Casanova S, Mazzucco G, Barbiano di Belgiojoso G y col. Pattern of glomerular involvement in human immunodeficiency virus infected patients: an Italian study. *Am J Kidney Dis.* 1995;26:446–53.



- Chen YM, Liu Y, Zhou RF y col. Associations of gut-flora-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide, betaine and choline with non-alcoholic fatty liver disease in adults. *Sci Rep.* 2016;6:19076.
- Chhibber-Goel J, Gaur A, Singhal V y col. The complex metabolism of trimethylamine in humans: Endogenous and exogenous sources. *Expert Rev. Mol. Med.* 2016, 18, e8.
- Cho CE, Taesuan S, Malysheva OV y col. Trimethylamine-N-oxide (TMAO) response to animal source foods varies among healthy young men and is influenced by their gut microbiota composition: A randomized controlled trial. *Mol. Nutr. Food Res.* 2016.
- Choi AI, Li Y, Parikh C y col. Long-term clinical consequences of acute kidney injury in the HIV-infected. *Kidney Int.* 2010;78(5):478-485.
- Choi AI Rodriguez RA, Bacchetti P y col. The impact of HIV on chronic kidney disease outcomes. *Kidney Int.* 2007;72: 1380–7.
- Chu C, Umanski G, Blank A y col. Comorbidity-related treatment outcomes among HIV-infected adults in the Bronx, NY. *J Urban Health.* 2011;88:507–516.
- Collins HL, Drazul-Schrader D, Sulpizio AC y col. L-Carnitine intake and high trimethylamine N-oxide plasma levels correlate with low aortic lesions in apoE(-/-) transgenic mice expressing CETP. *Atherosclerosis* 2016, 244, 29–37.
- Conaldi PG, Biancone L, Bottelli A y col. HIV-1 kills renal tubular epithelial cells in vitro by triggering an apoptotic pathway involving caspase activation and Fas upregulation. *J Clin Invest.* 1998; 102: 2041-2049
- Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP y col. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J* 2003;24:987–1003

- Conte AH, Esmailian F, LaBounty T y col. The patient with the human immunodeficiency virus-1 in the cardiovascular operative setting. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2013; 27(1): 135-55.
- Craciun S, Balskus EP y col. Microbial conversion of choline to trimethylamine requires a glycy radical enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109(52):21307–21312.
- Crothers K, Griffith TA, McGinnis KA y col. The impact of cigarette smoking on mortality, quality of life, and comorbidity among HIV-positive veterans. *J Gen Intern Med* 2005;20: 1142-5.
- Crowe SM, Westhorpe CL, Mukhamedova N y col. The macrophage: the intersection between HIV infection and atherosclerosis. *J Leukoc Biol* 2010;87: 589–98
- Currier JS, Kendall MA, Henry WK y col. Progression of carotid artery intima-media thickening in HIV-infected and uninfected adults. *AIDS.* 2007;21:1137–1145.
- D'Agostino RB, Vasan RS, Pencina MJ y col. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2008;117(6):743–5.
- D'Ascenzo F, Quadri G, Cerrato E y col. A metaanalysis investigating incidence and features of stroke in HIV-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2015;16:839–43.
- D'Ascenzo F, Cerrato E, Biondi-Zoccai G y col. Acute coronary syndromes in human immunodeficiency virus patients: a meta-analysis investigating adverse event rates and the role of antiretroviral therapy. *Eur Heart J* 2012;33: 875–80.
- Dalmeijer GW, Olthof MR, Verhoef P y col. Prospective study on dietary intakes of folate, betaine, and choline and cardiovascular disease risk in women. *Eur. J. Clin. Nutr.* (2008) 62:386–94.

- D'Ettorre G, Ceccarelli G, Pavone P y col. "What happens to cardiovascular system behind the undetectable level of HIV viremia? AIDS Res Ther (2016).
- Deeks SG, Kitchen CM, Liu L y col. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood*. 2004.104: 942–947.
- Demarquoy J, Georges B, Rigault C y col. Radioisotopic determination of L-carnitine content in foods commonly eaten in Western countries. *Food Chem* 2004;86:137–42.
- Detrano R, Guerci AD, Carr JJ y col. Coronary calcium as a predictor of coronary events in four racial or ethnic groups. *N Engl J Med*. 2008;358:1336–1345.
- Devine PJ, Carlson DW, Taylor AJ y col. Clinical value of carotid intima-media thickness testing. *J Nucl Cardiol* 2006;13:710-8.
- Dillon SM, Lee EJ, Kotter CV y col. An altered intestinal mucosal microbiome in HIV-1 infection is associated with mucosal and systemic immune activation and endotoxemia. *Mucosal Immunol*.2014. 7: 983–994.
- Dillon y col. Gut dendritic cell activation links an altered colonic microbiome to mucosal and systemic T-cell activation in untreated HIV-1 infection. *Mucosal Immunol*.2016. 9: 24–37.
- Dillon SM, Lee EJ, Kotter CV y col. The gut microbiome and HIV-1 pathogenesis: A two-way street. *AIDS* 2016, 30, 2737–2751.
- Dinh DM, Volpe GE, Duffalo C y col. Intestinal microbiota, microbial translocation, and systemic inflammation in chronic HIV infection. *J Infect Dis*. 2015;211:19–27.
- DiNicolantonio JJ, Lavie CJ, Fares H y col. L-Carnitine in the secondary prevention of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin. Proc.*(2013) 88:544–51.

- Documento de consenso de GeSida/PNS sobre TAR (enero 2018) [http://gesida-seimc.org/wp-content/uploads/2018/01/gesida\\_TAR\\_adultos\\_v3-1.pdf](http://gesida-seimc.org/wp-content/uploads/2018/01/gesida_TAR_adultos_v3-1.pdf).
- Documento de consenso sobre alteraciones metabólicas y riesgo cardiovascular en PVVIH Actualización Febrero 2017 consultado el 23/04/2028 [http://gesida-seimc.org/wp-content/uploads/2017/02/gesida-guiasclinicas-2017-Alteraciones\\_Metabolicas\\_y\\_RCV\\_VIH.pdf](http://gesida-seimc.org/wp-content/uploads/2017/02/gesida-guiasclinicas-2017-Alteraciones_Metabolicas_y_RCV_VIH.pdf).
- Doucet C, Dutheil D, Petit I y col. Influence of colloid, preservation medium and trimetazidine on renal medulla injury. *Acta Biochim Biophys* 2004;1673:105–14.
- Dubourg y col. Impact of HIV on the human gut microbiota: Challenges and perspectives. *Human Microbiome Journal* 2 (2016) 3–9.
- Dumas ME, Kinross J, Nicholson JK y col. Metabolic phenotyping and systems biology approaches to understanding metabolic syndrome and fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2014;146:46–62.
- Duprez DA, Neuhaus J, Kuller LH y col. INSIGHT SMART Study Group. Inflammation, coagulation and cardiovascular disease in HIV-infected individuals. *PloS One*. 2012;7:e44454.
- Duprez DA y col. Kuller LH, Tracy R y col. Lipoprotein particle subclasses, cardiovascular disease and HIV infection. *Atherosclerosis*. 2009;207(2):524–9.
- Elliott MK, McCaughan JA, Fogarty DG y col. Do patients with chronic kidney disease get optimal cardiovascular risk reduction? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014;23:267–274.
- El-Sadr WM, Mullin CM, Carr A y col. Effects of HIV disease on lipid, glucose and insulin levels: results from a large antiretroviral-naive cohort. *HIV Med*. 2005;6(2):114–21.

- Esser S, Gelbrich G, Brockmeyer N y col. Prevalence of cardiovascular diseases in HIV-infected outpatients: results from a prospective, multicenter cohort study. *Clin Res Cardiol.* 2013;102:203–213.
- Estes JD, Harris LD, Klatt NR y col. Damaged intestinal epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1001052.
- Fabian J, Naicker S y col. HIV and kidney disease in sub-Saharan Africa. *Nat Rev Nephrol.* 2009; 5:591-598.
- Fennema D, Phillips IR, Shephard EA y col. Trimethylamine and trimethylamine N-oxide, a flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3)-mediated host-microbiome metabolic axis implicated in health and disease. 2016, *Drug Metab Dispos* 44: 1839–1850.
- Ficha tecnica Tenofovir difumarato consultado el 31 de mayo 2018 en [www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/.../WC500051737.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/.../WC500051737.pdf)
- Fine DM<sup>1</sup>, Wasser WG, Estrella MM y col. APOL1 risk variants predict histopathology and progression to ESRD in HIV-related kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 23: 343–350, 2012.
- Finelli L, Miller JT, Tokars JI y col. National surveillance of dialysis-associated diseases in the United States, 2002. *Semin Dial.* 2005; 18:52–61.
- Fisher SD, Kanda BS, Miller TL y col. Cardiovascular disease and therapeutic drug-related cardiovascular consequences in HIV-infected patients. *Am J Cardiovasc Drugs* 2011; 11(6): 383- 94.
- Fitch KV, Srinivasa S, Abbara S y col. Noncalcified coronary atherosclerotic plaque and immune activation in HIV-infected women. *J Infect Dis* 2013;208:1737–46.
- Freiberg MS, Chang CC, Kuller LH y col. HIV infection and the risk of acute myocardial infarction. *JAMA Intern Med.* 2013;173:614–622.

- Freitas P, Carvalho D, Santos AC y col. Adipokines, hormones related to body composition, and insulin resistance in HIV fat redistribution syndrome. *BMC Infect Dis.* 2014;14:347.
- Friis-Møller N, Weber R, Reiss P y col. Cardiovascular disease risk factors in HIV patients--association with antiretroviral therapy. Results from the DAD study. *AIDS* 2003; 17: 1179-1193.
- Fukami K, Yamagishi S, Sakai K y col. Oral L-carnitine supplementation increases trimethylamine-N-oxide but reduces markers of vascular injury in hemodialysis patients. *J Cardiovasc Pharmacol* 2015;65:289–95.
- Giannarelli C, Klein RS, Badimon JJ y col. Cardiovascular implications of HIV-induced dyslipidemia. *Atherosclerosis* 2011; 219(2): 384-9.
- Gibellini D, Borderi M, Clò A y col. Antiretroviral molecules and cardiovascular diseases. *New Microbiol* 2012; 35(4) 359-75.
- Gibellini D, Borderi M, Clò A y col. HIV-related mechanisms in atherosclerosis and cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Med* 2013; 14(11): 780-90.
- Gili S, Grosso Marra W, D'Ascenzo F y col. Comparative safety and efficacy of statins for primary prevention in human immunodeficiency virus-positive patients: a systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J* 2016;37:3600–9.
- Glass TR, Ungsedhapand C, Wolbers M y col. Prevalence of risk factors for cardiovascular disease in HIV-infected patients over time: the Swiss HIV Cohort Study. *HIVMed.*2006;7:404–10.
- Go AS, Mozaffarian D, Roger VL y col. "Heart disease and stroke statistics — 2014 update: a report from the American Heart Association" *Circulation.* 2014;129(3):e28–e292).
- Goldstein L, Funkhouser D y col. Biosynthesis of trimethylamine oxide in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.* 1972 42(1):51-7.

- Gómez F, Camps J, Simó JM y col. Agreement study of methods based on the elimination principle for the measurement of LDL- and HDL-cholesterol compared with ultracentrifugation in patients with liver cirrhosis. *Clin Chem*. 2000; 46:1188– 1191.
- Gori A, Rizzardini G, Van't Land B y col. Specific prebiotics modulate gut microbiota and immune activation in HAART-naïve HIV-infected adults: Results of the “COPA” pilot randomized trial. *Nature* 2011, 4, 554–563.
- Gresele P, Falcinelli E, Sebastiano M y col. Endothelial and platelet function alterations in HIV-infected patients. *Thromb Res* 2012; 129(3): 301-8.
- Grunfeld C, Kotler DP, Hamadeh R y col. Hypertriglyceridemia in the acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Med.* 1989;86(1),27–31.
- Gupta S, Allen-Vercoe E, Petrof EO y col. Fecal microbiota transplantation: in perspective. *Therap Adv Gastroenterol*. 2016; 9(2):229-39.
- Gutierrez E y col. Glomerulopathies associated to HIV infection: a Spanish perspective. *Nefrología*. 2007;27:439–47.
- Gutiérrez E, Morales E, Gutiérrez Martínez E y col. HIV/AIDS infection: The beginning of the end for today's greatest pandemic? *Rev Clin Esp*. 2017 Nov;217(8):468-472.
- Heuten H, Goovaerts I, Ennekens G y col. Carotid artery intima-media thickness is associated with coronary artery disease. *Acta Cardiol*, 63 (2008), pp. 309-313.
- Hai X, Landeras V, Dobre MA y col. Mechanism of prominent trimethylamine oxide (TMAO) accumulation in hemodialysis patients. *PLoS One*. 2015; 10(12):e014331.

- Haassman JM, Haugaard AK, Ostrowski SR y col. Microbiota-dependent metabolite and cardiovascular disease marker trimethylamine-N-oxide (TMAO) is associated with monocyte activation but not platelet function in untreated HIV infection. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):445.
- Haassman JM, Knudsen A, Hoel H y col. Microbiota dependent marker TMAO is elevated in silent ischemia but is not associated with first-time myocardial infarction in HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2016;71(2):130-6
- Hauet T, Baumert H, Gibelin H y col. Citrate, acetate and renal medullary osmolyte excretion in urine as predictor of renal changes after cold ischaemia and transplantation. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:1093–8.
- Herlitz LC, Mohan S, Stokes MB y col. Tenofovir nephrotoxicity: Acute tubular necrosis with distinctive clinical pathological and mitochondrial abnormalities. *Kidney Int.* 2010;78(11):1171-7.
- Hsu DC, Ma YF, Hur S y col. Plasma IL-6 levels are independently associated with atherosclerosis and mortality in HIV-infected individuals on suppressive antiretroviral therapy. *AIDS.* 2016;30(13):2065-74
- Hsu WY, Lo WY, Lai CC y col. Rapid screening assay of trimethylaminuria in urine with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. 2007. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2007;21(12):1915-9.
- Hsue PY, Hunt PW, Schnell A y col. Role of viral replication, antiretroviral therapy, and immunodeficiency in HIV-associated atherosclerosis. *AIDS.* 2009. 1;23(9):1059-67.
- Hsue PY, Lo JC, Franklin A y col. Progression of atherosclerosis as assessed by carotid intima-media thickness in patients with HIV infection. *Circulation.* 2004.6;109(13):1603-8.
- Hulten E, Mitchell J, Scally J y col. HIV positivity, protease inhibitor exposure and subclinical atherosclerosis: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Heart.* 2009.95(22):1826-1835.



- Lerardi E, Sorrentino C, Principi M y col. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine: A novel insight in the cardiovascular risk scenario. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 2015, 4,289–292.
- Informe 2014 Instituto Nacional de Estadística (INE). Consultado el 22 agosto 2017).<https://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/estadisticas/estMinisterio/mortalidad/docs/PatronesMortalidadEspana2014.1.pdf>
- Informe UNAIDS. Consultado 29 de julio 2018:  
[www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/UNAIDS\\_FactSheet\\_es](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_es).
- INSIGHT START Study Group. Initiation of antiretroviral therapy in early asymptomatic HIV infection. *N Engl J Med* 2015;373:795–807.
- Inst.Med., Natl. Acad. 1998. Choline. In *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*, 1:390–422. Washington, DC: Natl. Acad.
- Izzedine H, M'rad MB, Bardier A y col. Atazanavir crystal nephropathy. *AIDS*. 2007. 21: 2357–2358.
- Jacobson TA, Maki KC, Orringer CE y col. National lipid association recommendations for patient-centered management of dyslipidemia: Part 2. *J Clin Lipidol* 2015; 9(6): 1-122.
- Johnson DW y col. A flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometric method for the simultaneous measurement of trimethylamine and trimethylamine N-oxide in urine. 2008. *J. Mass Spectrom.* 43:495–99.
- Juonala M, Magnussen CG, Venn A y col. Influence of age on associations between childhood risk factors and carotid intima-media thickness in adulthood: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study, the Childhood Determinants of Adult Health Study, the Bogalusa Heart Study, and the Muscatine Study for the international Childhood Cardiovascular Cohort (i3C) consortium. *Circulation*. 2010;122:2514-2520.

- Kaplan-Lewis E, Aberg JA, Lee M y col. Atherosclerotic cardiovascular disease and antiretroviral therapy. *Curr HIV/AIDS Rep* 2016;13:297-308.
- Kaysen GA, Johansen KL, Chertow GM y col. Associations of trimethylamine N-oxide with nutritional and inflammatory biomarkers and cardiovascular outcomes in patients new to dialysis. *J. Ren. Nutr.* 2015(4)25:351–56.
- Kearns A, Kearns A, Gordon J y col. “HIV-1–Associated Atherosclerosis: Unraveling the Missing Link” *J Am Coll Cardiol.* 2017;69(25):3084–98.
- Kelesidis T, Kendall MA, Yang OO y col. Biomarkers of microbial translocation and macrophage activation: association with progression of subclinical atherosclerosis in HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2012;206:1558–67.
- Kim RB Morse BL, Djurdjev O y col. Advanced chronic kidney disease populations have elevated trimethylamine N-oxide levels associated with increased cardiovascular events. *Kidney Int.* 2016, 89, 1144–1152.
- Klatt NR, Canary LA, Sun X y col. Probiotic/prebiotic supplementation of antiretrovirals improves gastrointestinal immunity in SIV-infected macaques. *J. Clin. Investig.* 2013, 123, 903–907.
- Klatt NR, Chomont N, Douek DC y col. Immune activation and HIV persistence: implications for curative approaches to HIV infection. *Immunol Rev* 2013;254:326–42.
- Klein DB, Leyden WA, Xu L y col. Declining relative risk for myocardial infarction among HIV-positive compared with HIV-negative individuals with access to care. *Clin Infect Dis.* 2015;60:1278–1280.
- Klotman PE y col. HIV-associated nephropathy. *Kidney Int.* 1999;56:1161–76.
- Knudsen A, Christensen TE, Thorsteinsson K y col. Microbiota-Dependent Marker TMAO is Not Associated With Decreased Myocardial Perfusion in Well-Treated HIV-Infected Patients as Assessed by <sup>82</sup>Rubidium PET/CT. *J Acquir Immune Defic Syndr* \_ Volume 72, Number 4, August 1, 2016.

- Koeth RA, Wang Z, Levison BS y col. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med* 2013;19:576–85.
- Kooman JP, van der Sande FM, Leunissen KM y col. Kidney disease and aging: a reciprocal relation. *Exp Gerontol* 2017; 87: 156-9.
- Kopp JB Nelson GW, Sampath K y col. APOL1 genetic variants in focal segmental glomerulosclerosis and HIV associated nephropathy. *J AmSocNephrol* 22: 2129–2137, 2011.
- Krauskopf K, Van Natta ML, Danis RP y col. Studies of the Ocular Complications of AIDS Research Group. Correlates of hypertension in patients with AIDS in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Int Assoc Provid AIDS Care*. 2013;12:325–333.
- Krikke M, Hoogeveen RC, Hoepelman AI y col. Cardiovascular risk prediction in HIV-infected patients: comparing the Framingham, atherosclerotic cardiovascular disease risk score (ASCVD), Systematic Coronary Risk Evaluation for the Netherlands (SCORE-NL) and Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs (D:A:D) risk prediction models. *HIV Med* 2016;17:289-297.
- Kuhn T, Rohrmann S, Sookthai D y col. Intra-individual variation of plasma trimethylamine-N-oxide (TMAO), betaine and choline over 1 year. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55(2):261–8.
- Kuller LH, Tracy R, Belloso W y col. INSIGHT SMART Study Group. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS Med*. 2008;5:e203.
- Lake JE, Currier JS y col. Metabolic disease in HIV infection. *Lancet Infect Dis* 2013;13: 964-75.
- Lake JE y col. The fat of the matter: obesity and visceral adiposity in treated HIV infection. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2017;14(6):211–9.

- Lakoski SG, Greenland P, Wong ND y col. Coronary artery calcium scores and risk for cardiovascular events in women classified as “low risk” based on Framingham risk score: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Arch Intern Med.* 2007;167:2437–2442.
- Lang S, Mary-Krause M, Cotte L y col. Increased risk of myocardial infarction in HIV-infected patients in France, relative to the general population. *AIDS.* 2010;24:1228–1230.
- Lee MB, Storer MK, Blunt JW y col. Validation of <sup>1</sup>H NMR spectroscopy as an analytical tool for methylamine metabolites in urine. 2006 *Clin. Chim. Acta* 365:264–69.
- Levey AS, Stevens LA, Schmid CH y col. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009; 150:604–612.
- Lever M, George PM, Slow S y col.. Betaine and trimethylamine-N-oxide as predictors of cardiovascular outcomes show different patterns in diabetes mellitus: an observational study. *PloS One* 2014;9:e114969.
- Lewden C, May T, Rosenthal E y col. Changes in causes of death among adults infected by HIV between 2000 and 2005: the “Mortalité 2000 and 2005” surveys (ANRS EN19 and Mortavic) *J Acquir Immune Defic Syndr*, 48 (2008), pp. 590-598.
- Lewis GD, Wei R, Liu E y col. Metabolite profiling of blood from individuals undergoing planned myocardial infarction reveals early markers of myocardial injury. *J Clin Invest* 2008.118:3503–3512.
- Li Y, Shlipak MG, Grunfeld C y col. Incidence and risk factors for acute kidney injury in HIV infection. *Am J Nephrol.* 2012;35(4): 327-334.
- Lifson AR, Neuhaus J, Arribas JR y col. Smoking-related health risks among persons with HIV in the Strategies for Management of Antiretroviral Therapy clinical trial. *Am J Public Health* 2010; 100: 1896-1903.

- Liu, J, Williams B, Frank D, Inside Out: HIV, the gut microbiome, and the mucosal immune system. *J. Immunol.* 2017, 198, 605–614. 22.
- Lloyd-Jones DM, Hong Y, Labarthe D y col. American Heart Association Strategic Planning Task Force and Statistics. Defining and setting national goals for cardiovascular health promotion and disease reduction: the American Heart Association's strategic Impact Goal through 2020 and beyond. *Circulation.* 2010;121:586–613.
- Lo J, Abbara S, Shturman L y col. Increased prevalence of subclinical coronary atherosclerosis detected by coronary computed tomography angiography in HIV-infected men. *AIDS* 2010;24:243–53.
- Lozano R, Naghavi M, Foreman K y col. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2012;380:2095–2128.
- Lozupone CA, Rhodes ME, Neff CP y col. HIV-induced alteration in gut microbiota: driving factors, consequences, and effects of antiretroviral therapy. *Gut Microbes.* 2014;5:562–70.
- Lozupone CA, Li M, Campbell TB y col. 2013. Alterations in the gut microbiota associated with HIV-1 infection. *Cell Host Microbe.* 2013.14: 329– 339.
- Mackay RJ, McEntyre CJ, Henderson C y col. Trimethylaminuria: causes and diagnosis of a socially distressing condition. 2011. *Clin. Biochem. Rev.* 32:33–43.
- Mafra D y col. Lobo JC, Barros AF y col. Role of altered intestinal microbiota in systemic inflammation and cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Future Microbiol.* 2014;9:399–410.
- Mafune A, Iwamoto T, Tsutsumi Y y col. Associations among serum trimethylamine-N-oxide (TMAO) levels, kidney function and infarcted coronary artery number in patients undergoing cardiovascular surgery: a cross-sectional study. *Clin. Exp. Nephrol.* 2016. 20:731–39.

- Hove-Skovsgaard M, Gaardbo JC, Kolte L y col. HIV-infected persons with type 2 diabetes show evidence of endothelial dysfunction and increased inflammation BMC Infectious Diseases (2017) 17:234.
- Marchetti G, Bellistri GM, Borghi E y col. Microbial translocation is associated with sustained failure in CD4+ T-cell reconstitution in HIVinfected patients on long-term highly active antiretroviral therapy. AIDS. 2008;22:2035–8.
- Marrugat J y col. An adaptation of the Framingham coronary heart disease risk function to European Mediterranean areas. J Epidemiol Community Health. 2003 Aug;57(8):634–8.
- Martinez y col. D'Agostino R, Sullivan L, Incidence and causes of death in HIV-infected persons receiving highly active antiretroviral therapy compared with estimates for the general population of similar age and from the same geographical area HIV Medicine, 8 (2007) pp. 251-258.
- Marzo, A, Curti S. y col. L-Carnitine moiety assay: An up-to-date reappraisal covering the commonest methods for various applications. J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 1997, 702, 1–20.
- McComsey, O'Riordan M, Hazen SL y col. Increased carotid intima media thickness and cardiac biomarkers in HIV infected children AIDS, 21 (2007), pp. 921-927.
- McHardy, Li X, Tong M y col. HIV Infection is associated with compositional and functional shifts in the rectal mucosal microbiota. Microbiome. 2013.1: 26.
- McKibben RA, Margolick JB, Grinspoon S y col. Elevated Levels of Monocyte Activation Markers Are Associated With Subclinical Atherosclerosis in Men With and Those Without HIV Infection. J Infect Dis., 211(2014), pp.1219-1228.
- Meir-Shafir K, Pollack S. y col. “Accelerated aging in HIV patients,” Rambam Maimonides Medical Journal vol. 3,no. 4, article e0025, 2012.

- Menziozzi M, Zona S, Santoro A y col. CD4/CD8 ratio is not predictive of multi-morbidity prevalence in HIV-infected patients but identify patients with higher CVD risk. *J Int AIDS Soc.*,17 (2014), p.19709.
- Mente A, Chalcraft K, Ak H y col. The relationship between trimethylamine-N-oxide and prevalent cardiovascular disease in a multiethnic population living in Canada. *Can. J. Cardiol.*2105.31:1189–94.
- Metkus TS, Brown T, Budoff M y col. HIV infection is associated with an increased prevalence of coronary noncalcified plaque among participants with a coronary artery calcium score of zero: Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). *HIV Med.* 2015 Nov; 16(10):635-9.
- Meyer KA, Benton TZ, Bennett BJ y col. The microbiota-dependent metabolite trimethylamine N-oxide (TMAO) and coronary artery calcium in the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study (CARDIA). 2016 *J. Am. Heart Assoc.* 5:e003970.
- Miao J, Ling AV, Manthena PV y col. Morbid Obesity Study Group; y col. Flavin-containing monooxygenase 3 as a potential player in diabetes-associated atherosclerosis. *Nat. Commun.* 2015, 6, 6498.
- Millard HR, Musani SK, Dibaba DT y col. Dietary choline and betaine;associations with subclinical markers of cardiovascular disease risk and incidence of CVD, coronary heart disease and stroke: the Jackson Heart Study. *Eur J Nutr.* 2018 Feb;57(1):51-60.
- Miller CA, Corbin KD, da Costa KA y col. Effect of egg ingestion on trimethylamine-N-oxide production in humans: a randomized, controlled, dose-response study. *Am J Clin Nutr* 2014; 100:778–86.
- Miller PE, Haberlen SA, Brown TT y col. Brief report: intestinal microbiota-produced trimethylamine-N-oxide and its association with coronary stenosis and HIV serostatus. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2016; 72:114–8.

- Mills GA, Walker V, Mughal H. y col. Quantitative determination of trimethylamine in urine by solidphase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. 1999, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 723:281–85.
- Missailidis C, Hällqvist J, Qureshi AR y col. Serum trimethylamine-N-oxide is strongly related to renal function and predicts outcome in chronic kidney disease. *PLOS ONE*. 2016.11:e0141738.
- Missailidis C, Neogi U, Stenvinkel P y col. The microbial metabolite TMAO in association with inflammation and microbial dysregulation in three HIV cohorts at various disease stages; *AIDS*. 2018 Jul 31;32(12):1589-1598.
- Mocroft A, Kirk O, Gatell J y col. Chronic renal failure among HIV-1-infected patients. *AIDS*. 2007;21:1119–27.
- Monahan M, Tanji N, Klotman PE. HIV-associated nephropathy: an urban epidemic. *Semin Nephrol*. 2001;21:394–402.
- Mooney S, Tracy R, Osler T y col. Elevated Biomarkers of Inflammation and Coagulation in Patients with HIV Are Associated with Higher Framingham and VACS Risk Index Scores. *PLoS One*. 2015 Dec 7;10(12):e0144312.
- Kasembeli AN, Duarte R, Ramsay M y col. APOL1 risk variants are strongly associated with HIV associated nephropathy in black South Africans. *J Am Soc Nephrol* 26: 2882–2890, 2015.
- Mueller DM, Allenspach M, Othman A y col. Plasma levels of trimethylamine-N-oxide are confounded by impaired kidney function and poor metabolic control. *Atherosclerosis* 2015, 243, 638–644.
- Mugwanya KK, Wyatt C, Celum C y col. Changes in glomerular kidney function among HIV-1-uninfected men and women receiving emtricitabine-tenofovir disoproxil fumarate preexposure prophylaxis: a randomized clinical trial. *JAMA Intern Med*. 2015;175(2): 246-254.



- Mateen FJ, Kanters S, Kalyesubula R y col. Hypertension prevalence and Framingham risk score stratification in a large HIV-positive cohort in Uganda. *J Hypertens.* 2013;31:1372–1378; discussion 1378.
- Mutlu EA, Keshavarzian A, Losurdo J y col. A compositional look at the human gastrointestinal microbiome and immune activation parameters in HIV infected subjects. *PLoS Pathog.* 2014;10:e1003829.
- Nadkarni GN, Konstantinidis I, Wyatt CM y col. HIV and the aging kidney. *Curr Opin HIV AIDS* 2014; 9: 340-5.
- Nadkarni GN, Patel AA, Yacoub R y col. The burden of dialysis-requiring acute kidney injury among hospitalized adults with HIV infection: a nationwide inpatient sample analysis. *AIDS.* 2015;29(9): 1061-1066.
- Nagatomo Y, Tang WH y col. Intersections between microbiome and heart failure: revisiting the gut hypothesis. *J Card Fail* (2015).21:973–980.
- Naicker S, Rahmanian S, Kopp J y col. HIV and chronic kidney disease. *Clinical Nephrology*, Vol. 83 – Suppl. 1/2015 (S32-S38).
- Nallu A, Sharma S, Ramezani A y col. Gut microbiome in chronic kidney disease: Challenges and opportunities. *Transl. Res.* 2017, 179, 24–37.
- Namiesnik J, Zygmunt B, Jastrzebska A y col. Application of solid-phase microextraction for determination of organic vapours in gaseous matrices. 2000. *J. Chromatogr. A* 885 405–18.
- Nduka C, Sarki A, Uthman O y col. Impact of antiretroviral therapy on serum lipoprotein levels and dyslipidemias: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol.* 2015;199:307–18.
- Nery MW, Martelli CM, Silveira EA y col. Cardiovascular risk assessment: A comparison of the Framingham, PROCAM, and DAD equations in HIV-infected persons. *Sci World J* 2013; 2013: 969281.

- Neuhaus J, Jacobs DR Jr, Baker JV y col. Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection. *J. Infect. Dis.* 2010.201: 1788–1795.
- Nezu T, Hosomi N, Aoki S y col. Carotid Intima-Media Thickness for Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2016;23(1):18-31.
- Nix LM, Tien PC y col. Metabolic syndrome, diabetes, and cardiovascular risk in HIV. *Curr HIV/AIDS Rep* 2014; 11(3): 271-8.
- Nowak P, Troseid M, Avershina E y col. Gut microbiota diversity predicts immune status in HIV-1 infection. *AIDS.* 2015;29:2409–18.
- Nowiński A, Ufnal M y col. Trimethylamine N-oxide: A harmful, protective or diagnostic marker in lifestyle diseases? *Nutrition.* 2018 Feb;46:7-12.
- O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA y col. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. *N Engl J Med,* 340 (1999), pp. 14-22.
- Obeid R, Awwad HM, Rabagny Y y col. Plasma trimethylamine N-oxide concentration is associated with choline, phospholipids, and methyl metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 2016. 103:703–11.
- Obeid R y col. The metabolic burden of methyl donor deficiency with focus on the betaine homocysteine methyltransferase pathway. *Nutrients.*2013. 5:3481–3495.
- Paisible AL y col. HIV infection, cardiovascular disease risk factor profile, and risk for acute myocardial infarction. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2015;68:209–216.
- Palella FJ, Li X, Gupta SK y col. Long-term kidney function, proteinuria, and associated risks among HIV-infected and uninfected men. *AIDS* 2018, 32:1247–1256.

- Parsa A, Kao WH, Xie D y col. Study Investigators; CRIC Study Investigators: APOL1 risk variants, race, and progression of chronic kidney disease. *N Engl J Med* 369: 2183–2196, 2013.
- Pedersen KK, Manner IW, Seljeflot I y col. Monocyte activation, but not microbial translocation, is independently associated with markers of endovascular dysfunction in HIV-infected patients receiving cART. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2014;67:370–4.
- Pereyra F, Lo J, Triant VA y col. Increased coronary atherosclerosis and immune activation in HIV-1 elite controllers. *AIDS* 2012;26:2409–12.
- Petoumenos K, Reiss P, Ryom L y col. Increased risk of cardiovascular disease (CVD) with age in HIV-positive men: a comparison of the D:A:D CVD risk equation and general population CVD risk equations. *HIVMed*2014;15(10):595–603.
- Petoumenos K, Reiss P, Ryom L D:A:D study group Increased risk of cardiovascular disease (CVD) with age in HIV-positive men: a comparison of the D:A:D CVD risk equation and general population CVD risk equations. *HIV Med.* 2014;15:595–603.
- Petrof EO, Gloor GB, Vanner SJ y col. Stool substitute transplant therapy for the eradication of *Clostridium difficile* infection: 'RePOOPulating' the gut. *Microbiome.* 2013 Jan 9; 1(1):3.
- Pinto DSM, da Silva MJLV. y col.; Cardiovascular Disease in the Setting of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Curr Cardiol Rev.* 2018 14;14(1):25-41.
- Posada-Ayala M, Zubiri I<sup>1</sup>, Martin-Lorenzo M<sup>1</sup> y col. Identification of a urine metabolomic signature in patients with advanced-stage chronic kidney disease. *Kidney Int.*2014.85:103–11.
- Post WS, Budoff M, Kingsley L y col. Associations between HIV infection and subclinical coronary atherosclerosis. *Ann Intern Med.* 2014;160:458–467.

- Prospective Studies Collaboration. Lewington S, Whitlock G, Clarke R y col. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet*. 2007; 370:1829–1839.
- Qi J, You T, Li J y col. Circulating trimethylamine N-oxide and the risk of cardiovascular diseases: a systematic review and meta-analysis of 11 prospective cohort studies. *J Cell Mol Med*. 2018 ;22(1):185-194.
- Ramezani A, Raj DS y col. The gut microbiome, kidney disease, and targeted interventions. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25:657–670.
- Ramezani A, Massy ZA, Meijers B y col. Role of the gut microbiome in uremia: A potential therapeutic target. *Am. J. Kidney Dis*. 2016, 67, 483–498.
- Regan S, Meigs J, Massaro J y col. Evaluation of the ACC/AHA CVD risk prediction algorithm among HIV-infected patients. Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Abstract Number: 751.2019. February 23-26, 2015 | Seattle, Washington.
- Rhee EP, Clish CB, Ghorbani A y col. A combined epidemiologic and metabolomic approach improves CKD prediction. 2013 *J. Am. Soc. Nephrol*. 24:1330–38.
- Rigault C, Mazué F, Bernard A y col. Changes in L-carnitine content of fish and meat during domestic cooking. *Meat Sci* 2008;78:331–5.
- Rodriguez-Torres M, Govindarajan S, Sola R y col. Hepatic steatosis in HIV/HCV co-infected patients: correlates, efficacy and outcomes of anti-HCV therapy: a paired liver biopsy study. *J Hepatol* 2008; 48(5):756-764.
- Rohrmann S Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB y col. Meat consumption and mortality—results from the European prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *BMC Med*.(2013)11:63.

- Rohrmann S, Linseisen J, Allenspach M y col. Plasma concentrations of trimethylamine-N-oxide are directly associated with dairy food consumption and low-grade inflammation in a German adult population. 2016 *J. Nutr.* 146:283–89.
- Romano KA, Vivas EI, Amador-Noguez D y col. Intestinal microbiota composition modulates choline bioavailability from diet and accumulation of the proatherogenic metabolite trimethylamine-N-oxide. *MBio* 2015, 6, e02481.
- Ryom L, Mocroft A, Kirk O y col. D:A:D StudyGroup: Association between antiretroviral exposure and renal impairment among HIV-positive persons with normal baseline renal function: The D:A:D study. *J Infect Dis.* 2013;207(9):1359-69.
- Sabroe I, Jones EC, Usher LR y col. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol.* 2002;168:4701–10.
- Sackoff JE, Hanna DB, Pfeiffer MR y col. Causes of death among persons with AIDS in the era of highly active antiretroviral therapy: New York City . *Ann Intern Med.* 2006;145(6):397-406.
- Sandeep SK, Salem F, Wyatt CM y col. The changing epidemiology of HIV-related chronic kidney disease in the era of antiretroviral therapy; *Kidney International* (2014) 86, 259–265.
- Sandler NG, Wand H, Roque A y col. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *J Infect Dis.* 2011;203:780–90.
- Scherzer R, Association of tenofovir exposure with kidney disease risk in HIV infection. *J Infect Dis.* 2011;203(6):780-90.
- Schmid S, Opravil M, Moddel M y col. Acute interstitial nephritis of HIV-positive patients under atazanavir and tenofovir therapy in a retrospective analysis of kidney biopsies. *Virchows Arch.* 2007;450(6):665-70.

- Schugar RC, Brown JM y col. Emerging roles of flavin monooxygenase 3 in cholesterol metabolism and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 2015, 26(5): 426–431.
- Secil M, Altay C, Gulcu A y col. Automated measurement of intima-media thickness of carotid arteries in ultrasonography by computer software. *Diagn Interv Radiol* 2005; 11(2):105-108.
- Seibel BA, Walsh PJ. y col. Trimethylamine oxide accumulation in marine animals: relationship to acylglycerol storage. *J. Exp. Biol.* 2002. 205:297–306.
- Serban MC, Sahebkar A, Mikhailidis DP y col. Impact of L-carnitine on plasma lipoprotein(a) concentrations: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Sci Rep.* 2016;6:19188.
- Serrano-Villar S, Estrada V, Gómez-Garre D y col. Clinical factors and biomarkers associated with subclinical atherosclerosis in the human immunodeficiency virus infection. *Med Clín (Barc.)* 2012;139:231-237.
- Serrano-Villar S, Estrada V, Gómez-Garre D y col. Diagnosis of subclinical atherosclerosis in HIV-infected patients: Higher accuracy of the D:A:D risk equation over Framingham and SCORE algorithms. *Eur J Prev Cardiol* 2014; 21(6):739-48.
- Shah A, Kumar A y col. HIV-1 gp120-mediated mitochondrial dysfunction and HIV-associated neurological disorders. *Neurotox Res* 2016;30: 135–7.
- Shahbaz S, Manicardi M, Guaraldi G y col. Cardiovascular disease in human immunodeficiency virus infected patients: A true or perceived risk? *World J Cardiol.* 2015 Oct 26;7(10):633-44.
- Shan Z, Clish CB, Hua S y col. Gut Microbial-related Choline Metabolite Trimethylamine-N-oxide is Associated with Progression of Carotid Artery Atherosclerosis in HIV Infection. *J Infect Dis.* 2018 Jun 15.
- Shrestha S, Irvin MR, Grunfeld C y col. HIV, inflammation, and calcium in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34(2): 244-50.

- Siedner MJ. START or SMART? Timing of antiretroviral therapy initiation and cardiovascular risk for people with human immunodeficiency virus infection. *Open Forum Infect Dis* 2016;3:ofw032.
- Silverberg MJ, Leyden WA, Xu L y col. Immunodeficiency and risk of myocardial infarction among HIV-positive individuals with access to care. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2014;65:160–166.
- Sinha A, Ma Y, Scherzer R y col. TMAO and HIV-associated atherosclerosis. Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Seattle, WA Abstract No 755. 2015.
- Smith CJ, Ryom L, Weber R y col. Trends in underlying causes of death in people with HIV from 1999 to 2011 (D:A:D): a multicohort collaboration. *Lancet* 2014;384: 241–8.
- Smith JL, Wishnok JS, Deen WM y col. Metabolism and excretion of methylamines in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1994;125:296–308.
- Solomon MM, Lama JR, Glidden DV y col. Changes in renal function associated with oral emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate use for HIV pre-exposure prophylaxis. *AIDS*. 2014;28(6):851-859.
- Sorli M, Guelar A, Montero M y col. Chronic kidney disease prevalence and risk factors among HIV patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008;48:506–8.
- Srinivasa S, Fitch KV, Lo J y col. Plaque burden in HIV-infected patients is associated with serum intestinal microbiota-generated trimethylamine. *AIDS*. 2015;29:443–452.
- Stein JH, Currier JS, Hsue PY et al Arterial disease in patients with human immunodeficiency virus infection: what has imaging taught us? *J Am Coll Cardiol Img*, 7 (2014), pp. 515-525.

- Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT y col. ASE Consensus Statement. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. *J Am Soc Echocardiography*, 21 (2008), pp. 93-111.
- Stevens LA, Schmid CH, Greene T y col. Comparative performance of the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) and the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study equations for estimating GFR levels above 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>. *Am J Kidney Dis* 2010; 56(3):486-495.
- Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH y col. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2014; 63 (25 Pt B): 2889–2934.
- Strategies for Management of Antiretroviral Therapy (SMART) Study Group. CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment. *N Engl J Med* 2006;355:2283–96.
- Stubbs JR, House JA, Ocque AJ y col. Serum trimethylamine-N-oxide is elevated in CKD and correlates with coronary atherosclerosis burden. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2016. 27:305–13.
- Subramanian S, Tawakol A, Burdo TH y col. Arterial inflammation in patients with HIV. *JAMA.* 2012 Jul 25;308(4):379-86.
- Suchy-Dicey AM, Laha T, Hoofnagle A y col. Tubular secretion in CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27:2148–2155.
- Sun X, Jiao X, Ma Y y col. Trimethylamine N-oxide induces inflammation and endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells via activating ROS-TXNIP-NLRP3 inflammasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016, 481, 63–70.



- Sun Y, Ma Y, Lin P y col. 2016. Fecal bacterial microbiome diversity in chronic HIV-infected patients in China. *Emerg. Microbes Infect.* 2016. 5: e31.
- Svensson BG, Akesson B, Nilsson A y col. Urinary excretion of methylamines in men with varying intake of fish from the Baltic Sea. 1994 *J. Toxicol. Environ. Health* 41:411–20.
- Tang WH, Wang Z, Kennedy DJ y col. Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide (TMAO) pathway contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease. *Circ. Res.* 2015, 116, 448–455.
- Tang WH, Wang Z, Fan Y y col. Prognostic value of elevated levels of intestinal microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide in patients with heart failure: refining the gut hypothesis. 2014 *J. Am. Coll. Cardiol.* 64(18):1908–14.
- Tang WH, Wang Z, Li XS y col. Increased trimethylamine N-oxide portends high mortality risk independent of glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Chem.* 2017;63:297–306.
- Tang WH, Trimethylamine N-oxide as a novel therapeutic target in CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2016.27:8–10.
- Tang WH, Wang Z, Levison BS y col. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N. Engl. J. Med.* 2013, 368, 1575–1584.
- Tang WH, Wang Z, Shrestha K y col. Intestinal microbiota-dependent phosphatidylcholine metabolites, diastolic dysfunction, and adverse clinical outcomes in chronic systolic heart failure. *J Card Fail* (2015)21: 91–96.
- The Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration; Causes of Death in HIV-1—Infected Patients Treated with Antiretroviral Therapy, 1996–2006: Collaborative Analysis of 13 HIV Cohort Studies, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 50, Issue 10, 15 May 2010, Pages 1387–1396.

- Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002; 106:3143–3421.
- Tincati C, Douek DC , Marchetti G y col. Gut barrier structure, mucosal immunity and intestinal microbiota in the pathogenesis and treatment of HIV infection. *AIDS Res. Ther.* 2016, 13, 19.
- Treacy EP, Akerman BR, Chow LM y col. Mutations of the flavin-containing monooxygenase gene (FMO3) cause trimethylaminuria, a defect in detoxication. *Hum. Mol. Genet.* 1998. 7(5):839–45.
- Triant VA, Lee H, Hadigan C y col. Increased acute myocardial infarction rates and cardiovascular risk factors among patients with human immunodeficiency virus disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:2506–2512 .
- Troll JG. Approach to dyslipidemia, lipodystrophy, and cardiovascular risk in patients with HIV infection. *Curr Atheroscler Rep.* 2011;13(1):51–6.
- Troseid M y col. Microbiota- dependent metabolite trimethylamine-N-oxide is associated with disease severity and survival of patients with chronic heart failure. *J Intern Med* 2015;277:717–26.
- Troseid M, Ueland T, Hov JR y col. Major increase in microbiota-dependent proatherogenic metabolite TMAO one year after bariatric surgery. *Metab Syndr Relat Disord* (2016)14: 197–201.
- Trullas JC, Barril G, Cofan F y col.; and the Spanish HIV Infection in Dialysis Study Group. Prevalence and clinical characteristics of HIV type 1-infected patients receiving dialysis in Spain:results of a Spanish survey in 2006: GESIDA 48/05 study. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2008;24:1229–35.
- Tseng ZH y col. Sudden cardiac death in patients with human immunodeficiency virus infection. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59:1891–6.

- Ufnal M, Secemsky EA, Dowdy D y col. TMAO: A small molecule of great expectations; Nutrition. 2015 Nov-Dec;31(11-12).
- Ufnal M, Jazwiec R, Dadlez M y col. Trimethylamine- N-oxide: a carnitine-derived metabolite that prolongs the hypertensive effect of angiotensin II in rats. Can J Cardiol 2014;30:1700–5.
- US National Kidney Foundation Guidelines, consultado el 13 agosto 2018 en [https://www.kidney.org/professionals/guidelines/guidelines\\_commentaries/chronic-kidney-disease-classification](https://www.kidney.org/professionals/guidelines/guidelines_commentaries/chronic-kidney-disease-classification).
- Vachiat A, McCutcheon K, Tsabedze N y col. HIV and ischemic heart disease. J Am Coll Cardiol 2017;69:73–82.
- Vaziri ND, Vaziri ND, Wong J, Pahl M y col. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. Kidney Int. 2013 Feb; 83(2):308-15.
- Vázquez-Castellanos JF, Serrano-Villar S, Latorre A y col. Altered metabolism of gut microbiota contributes to chronic immune activation in HIV-infected individuals. Mucosal Immunol. 2015. 8: 760–772.
- Velasquez MT, Ramezani A, Manal A y col. Trimethylamine N-Oxide: The Good, the Bad and the Unknown; Toxins 2016, 8, 326.
- Verbrugge FH, Dupont M, Steels P y col. Abdominal contributions to cardiorenal dysfunction in congestive heart failure. J Am Coll Cardiol (2013)62: 485–495.
- Vigilancia Epidemiológica del VIH/SIDA en España. Sistema de Información sobre nuevos diagnósticos de VIH. Registro Nacional de casos de SIDA. Actualización a 30 de Junio de 2017. Acceso a través de <https://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/home.htm>.

- Vigneau C, Guiard-Schmid JB, Turret J y col. The clinical characteristics of HIV-infected patients receiving dialysis in France between 1997 and 2002. *Kidney Int.* 2005;67:1509–14.
- Vujkovic-Cvijin I, Dunham RM, Iwai S y col. Dysbiosis of the gut microbiota is associated with HIV disease progression and tryptophan catabolism. *Sci. Transl. Med.* 2013. 5: 193ra91.
- Hartiala J, Bennett BJ, Tang WH y col. Comparative genome-wide association studies in mice and humans for trimethylamine N-oxide, a proatherogenic metabolite of choline and L-carnitine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014, 34, 1307–1313.
- Wang Z, Levison BS, Hazen JE y col. Measurement of trimethylamine-N-oxide by stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 2014, 455, 35–40.
- Wang T, Yi R, Green LA y col. Increased cardiovascular disease risk in the HIV-positive population on ART: potential role of HIV Nef and Tat. *Cardiovasc Pathol* 2015; 24(5): 279-82.
- Wang Z, Roberts AB, Buffa JA y col. Non-lethal Inhibition of Gut Microbial Trimethylamine Production for the Treatment of Atherosclerosis. *Cell.* 2015 Dec 17; 163(7):1585-95.
- Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ y col. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 2011; 472:57–63.
- Wang Z, Tang WH, Buffa JA y col. Prognostic value of choline and betaine depends on intestinal microbiota-generated metabolite trimethylamine-N-oxide. *Eur Heart J* 2014; 35: 904–10.
- Warrier M, Shih DM, Burrows AC y col. The TMAO-Generating Enzyme Flavin Monooxygenase 3 Is a Central Regulator of Cholesterol Balance. *Cell Rep.* 2015 Jan 14; pii: S2211-1247(14)01065-1.

- WHO. Consultado el 29 de julio 2018 en <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>.
- Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D y col. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998; 97: 1837–1847.
- Wing MR Patel SS, Ramezani A y col. Gut microbiome in chronic kidney disease. *Exp. Physiol*. 2016, 101, 471–477.
- Womack JA, Chang CC, So-Armah KA y col. HIV infection and cardiovascular disease in women. *J Am Heart Assoc*. 2014;3:e001035.
- Wong G, Trevillyan JM, Fatou B y col. Plasma lipidomic profiling of treated HIV-positive individuals and the implications for cardiovascular risk prediction. *PLoS One* 2014; 9(4): e94810.
- Wyatt CM, Winston JA, Malvestutto CD y col. Chronic kidney disease in HIV infection: an urban epidemic. *AIDS*. 2007;21: 2101–3.
- Wzorek B, Mochalski P, Sliwka I y col. Application of GC-MS with a SPME and thermal desorption technique for determination of dimethylamine and trimethylamine in gaseous samples for medical diagnostic purposes; *J. Breath Res*. 4 (2010) 026002 (6pp).
- Yancey PH. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol*. 2005, 208, 2819–2830.
- Yancey PH, Rhea MD, Kemp KM y col. Trimethylamine oxide, betaine and other osmolytes in deep-sea animals: depth trends and effects on enzymes under hydrostatic pressure. *Cell Mol Biol* 2004;50:371–6.
- Yancey PH. Water stress, osmolytes and proteins. *Am Zool* 2001;41:699–709.
- Yang, Poles MA, Fisch GS y col. HIV-induced immunosuppression is associated with colonization of the proximal gut by environmental bacteria. *AIDS*. 2016. 30: 19–29.

- Yin J, Liao SX, He Y y col. Dysbiosis of gut microbiota with reduced trimethylamine-N-oxide level in patients with large-artery atherosclerotic stroke or transient ischemic attack. *J. Am. Heart Assoc.* 2015, 4, e002699.
- Zanni MV, Abbara S, Lo J y col. Increased coronary atherosclerotic plaque vulnerability by coronary computed tomography angiography in HIV-infected men. *AIDS* 2013;27:1263–72.
- Zanni MV, Schouten J, Grinspoon SK y col. Risk of coronary heart disease in patients with HIV infection. *Nat Rev Cardiol* 2014;11:728–41.
- Zanoni I, Granucci F y col. Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;3:32.
- Zeisel SH, Mar MH, Howe JC y col. Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods. *J. Nutr.* 2003 133:1302–7
- Zeisel SH, daCosta KA, Youssef M y col. Conversion of dietary choline to trimethylamine and dimethylamine in rats: Dose-response relationship. *J Nutr.* 1989;119:800–804.
- Zeisel SH, Wishnok JS, Blusztajn JK y col. Formation of methylamines from ingested choline and lecithin. *J Pharmacol Exp Ther.* 1983 May;225(2):320–4.
- Zeisel SH, DaCosta KA. y col. Increase in human exposure to methylamine precursors of N-nitrosamines after eating fish. *Cancer Res.* 1986. 46:6136–38.
- Zeisel SH, DaCosta KA, Fox JG. y col. Endogenous formation of dimethylamine. *Biochem J* 1985;232:403–8.
- Zhang AQ, Mitchell SC, Smith RL. y col. Discontinuous distribution of N-oxidation of dietary-derived trimethylamine in a British population. *Xenobiotica.* (1996);26:957–961.
- Zhang AQ, Mitchell S, Smith R. y col. Fish odour syndrome: verification of carrier detection test. 1995 *J. Inherit. Metab. Dis.* 18(6):669–74.

- Zhao X, Zeisel SH, Zhang S y col. Rapid LC-MRM-MS assay for simultaneous quantification of choline, betaine, trimethylamine, trimethylamine N-oxide, and creatinine in human plasma and urine. *Electrophoresis*. 2015 Sep;36(18):2207-2214.
- Zheng Y, Li Y, Rimm EB y col. Dietary phosphatidylcholine and risk of all-cause and cardiovascular-specific mortality among US women and men. *Am J Clin Nutr*. 2016 Jul;104(1):173-80.
- Zhu Y, Jameson E, Crosatti M y col. Carnitine metabolism to trimethylamine by an unusual Rieske-type oxygenase from human microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(11):4268–4273.
- Zhu W, Gregory JC, Org E y col. Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk. *Cell*. 2016;165:111–124.